

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DINIARA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ETÍLICA
ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS EM REATOR DE LEITO FIXO**

CURITIBA

2014

DINIARA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ETÍLICA
ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS EM REATOR DE LEITO FIXO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Nadia Krieger

Co-orientador: David Alexander Mitchell

CURITIBA

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

DINIARA SOARES

DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ETÍLICA ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS EM REATOR DE LEITO FIXO

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Profa. Dra. Nadia Krieger (Orientadora)
Departamento de Química – UFPR


Prof. Dr. Marcelo Müller-Santos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR


Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC


Prof. Dr. José Domingos Fontana
Departamento Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR (Campus Curitiba)


Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS.

Curitiba, 29 de janeiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Aos meus orientadores, professores Nadia Krieger e David Alexander Mitchell, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e críticas visando sempre um trabalho melhor.

Ao meu marido e companheiro Alan, pelo constante estímulo, orientação e paciência durante a realização deste trabalho e especialmente pelo amor e alegria durante todos os momentos compartilhados.

Aos professores da banca interna, Marcelo Müller-Santos e Jaime Paba, pelas valiosas sugestões e correções ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcos Corazza pelas sugestões e colaboração nos estudos de equilíbrio termodinâmico.

Ao Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR, em especial ao professor Roberto Pontarollo e à Letícia Leonart pela disponibilidade, ensinamentos e análises de água por Karl-Fischer.

À USDA pela oportunidade e disponibilidade da planta piloto para produção dos ácidos graxos, em especial ao meu pai Ubaldino pelos ensinamentos, estímulo e confiança em todos os momentos da minha vida.

À minha grande família, especialmente aos meus pais Ubaldino e Terezinha, meus irmãos, Jussara, Juciara, Jucélia, Juliana e Ubaldino Filho, e sobrinhos por simplesmente fazerem parte da minha vida e formação, e por me apoiarem sempre que precisei. À família Reis e Gonçalves, em especial à Vânia pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Arnaldo Glogauer e Viviane Martini pela amizade, receptividade e ensinamentos que contribuíram para os primeiros passos deste trabalho.

Aos amigos do NPDEAS e LTEB, Cassiana, Wellington, Jean, Sakuma, Maritza, Vanderléia, Robson, Débora, Michelle, Mirian, Jonas, Fernanda, Glauco, Thaís, Érika, Maura, Francine, Liana, Juliana, Edgar, Alessandra, Aline, Christiane, Viviane e Allen, pela amizade e momentos de descontração. Em especial à Maritza, Vanda e Mirian pela amizade, pelos cafés descontraídos e pelo esforço em manter as reuniões e confraternizações do LTEB. Ao Jonas pela amizade, apoio e valiosas

conversas e discussões sobre equilíbrio termodinâmico. Às minhas queridas amigas Aline, Vivi e Chris pelo carinho, amparo, amizade, momentos de descontração, conversas filosóficas, por sempre me apoiarem nos momentos desafiadores desta jornada e torcerem pelo meu sucesso.

Aos alunos de iniciação científica, Fernanda, Thamires, Edmilson e em especial ao Andrei, Keyla, Rodrigo e Alexandre pela dedicação, amizade e ajuda nos experimentos.

À UFPR e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho. À secretária Dona Irene pelas informações e solicitações atendidas. Em especial aos professores Miguel Nosedá e Sílvia Cadena pela compreensão e dedicação ao Programa de Pós-graduação, estimulando sempre o espírito científico e tornando possível o desenvolvimento do trabalho de todos.

Ao NPDEAS, em especial aos alunos que mantêm a organização do laboratório e aos professores José Viriato Coelho Vargas e André Mariano pela amizade e dedicação em manter um laboratório organizado, funcional e multidisciplinar.

Às minhas grandes amigas, Lorena, Rafaela, Vanessa, Carla e Andressa, pela amizade, lealdade, incentivo, momentos de descontração e por me ouvirem sempre que precisei. Ao meu amigo Nilzo pela amizade, ensinamentos e incentivo pela busca do aprimoramento pessoal, qualidade de vida e autoconhecimento. Ao Dr. Francisco Vairo pelas valiosas sessões de acupuntura e conselhos para uma vida saudável. Aos amigos Blás, Sílvia, Lourenço, Márcio, Mollinari por simplesmente me ouvirem sem julgamentos.

Aos membros da Banca Examinadora, professores Marcelo Müller-Santos, Marco Antônio Záchia Ayub, Agenor Furigo Junior e José Domingos Fontana pelo aceite ao convite da avaliação desta tese, disponibilidade e pelas valiosas correções e sugestões.

À CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

“Vencer a si próprio é a maior de todas as vitórias”

Platão

RESUMO

A síntese de biodiesel em processos industriais é feita principalmente por transesterificação alcalina de triacilgliceróis provenientes de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta. Novos processos e catalisadores têm sido estudados para possibilitar o uso de matérias-primas residuais, com teores significativos de ácidos graxos livres e água, inadequadas para o processo usual de produção de biodiesel. Estes estudos também contribuem para a utilização de processos com baixo impacto ambiental e diminuição dos custos de produção de biodiesel.

Recentemente, o processo de hidroesterificação vem sendo estudado para a produção de biodiesel, o qual envolve uma etapa de hidrólise dos triacilgliceróis seguida de esterificação dos ácidos graxos livres. Este processo permite a utilização de matérias-primas independente do teor de ácidos graxos livres e umidade, uma vez que na etapa de hidrólise os triacilgliceróis são misturados com água formando glicerol e ácidos graxos livres. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de esterificação etílica de ácidos graxos por catálise enzimática em reator de leito fixo preenchido com sólido fermentado com atividade lipolítica. Como substratos, foram utilizadas misturas de ácidos graxos obtidas por hidrólise em água subcrítica de matérias graxas de baixo custo, em ausência de catalisador.

Os micro-organismos de *Rhizopus microsporus* e *Burkholderia cepacia* foram utilizados para a produção de sólidos fermentados com atividade lipolítica por fermentação em estado sólido. Inicialmente, o sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* LTEB11 foi selecionado como catalisador e utilizado diretamente na reação de esterificação etílica de ácidos graxos. O óleo ácido da borra de soja foi selecionado como substrato para o estudo em reator de leito fixo em sistema livre de co-solvente, onde foram obtidos 92% de conversão em 31 h. A conversão obtida no primeiro ciclo foi mantida por 4 ciclos, diminuindo para 64% após 8 ciclos, equivalentes a 384 h de uso. Finalmente, para um melhor entendimento do processo, foi feito um estudo do equilíbrio termodinâmico da reação de esterificação, avaliando-se a composição das fases, a sorção dos componentes da reação no sólido fermentado e a conversão no equilíbrio. A maior conversão em éster foi obtida com razão molar (etanol:ácido graxo) 1,5:1 e foi maior do que a calculada por modelo termodinâmico (80%). A sorção dos componentes da reação influenciou na conversão no equilíbrio, que diminuiu com o aumento da sorção dos componentes hidrofílicos no sólido fermentado. As melhores condições estabelecidas neste estudo para síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo foram: 12% de sólido fermentado (em relação à massa de ácidos graxos livres) com umidade inicial de 10% (em base seca), sistema reacional mantido sem agitação, com recirculação apenas da fase orgânica, a 45°C. O processo de hidroesterificação possibilitou o uso de matérias-primas residuais sem necessidade de pré-tratamento, e a aplicação direta do sólido fermentado dispensou etapas adicionais de recuperação e imobilização da lipase. Estes fatores podem contribuir para a redução dos custos do processo de produção de biodiesel utilizando lipases.

Palavras-chave: biodiesel, hidroesterificação, óleo ácido da borra de soja, lipases, *Burkholderia cepacia*, fermentação em estado sólido, reator de leito fixo

ABSTRACT

The synthesis of biodiesel in industrial processes has been currently performed by alkaline transesterification of triacylglycerols from vegetable oils with short-chain alcohols. New processes and catalysts have been studied with the aim of introducing residual feedstocks, with significant amounts of free fatty acids and water, which are inappropriate for the current biodiesel production process. Consequently, these studies can provide an environmentally friendly and more economical way to produce biodiesel. Recently, the production of biodiesel by hydroesterification has been studied. This process involves a hydrolysis step of triacylglycerols followed by esterification step of the resulting free fatty acids. In comparison to transesterification, hydroesterification allows the use of feedstocks having higher free fatty acids and water contents, mainly because in the hydrolysis step the triacylglycerols are mixed with water to produce glycerol and free fatty acids. The objective of the present work was to develop an ethyl esterification process of fatty acids by enzymatic catalysis in packed-bed reactor containing a fermented solid having lipolytic activity. As substrates, the present study employed mixtures of fatty acids obtained from hydrolysis in subcritical water of low-value feedstocks, in the absence of catalyst. The micro-organisms *Rhizopus microsporus* and *Burkholderia cepacia* were used to produce fermented solids having lipolytic activity by solid-state fermentation. Initially, the fermented solid from *Burkholderia cepacia* LTEB11 was selected as catalyst and used directly in the esterification reactions. Soybean soapstock acid oil was then selected as the substrate for the study in packed-bed reactor containing the fermented solid, under solvent-free conditions. This process gave yields up to 92% of conversion in 31 h. The conversion obtained for the first cycle was maintained for 4 cycles, which decreased to 64% after 8 cycles (equivalent of 384 h operation). Finally, for a better understanding of the present process, a study on the esterification reaction thermodynamic equilibrium was also performed. In this case, phase composition, sorption of the reaction mixture components to the fermented solid and the equilibrium conversion were evaluated. This study indicated a better conversion with a molar ratio of 1.5:1 (ethanol:fatty acid), which were higher than that one calculated from the thermodynamic model (80%). The sorption of the components of the reaction mixture to the fermented solid influenced the conversion values, giving lower conversions for those reactions with increased sorption of the hydrophilic components. The best conditions established for the ester synthesis in packed-bed reactor were: 12% of fermented solid (in relation to the fatty acid mass) with 10% of moisture (dry base), with the reaction reservoir maintained without stirring and by only recirculating the organic phase through the fermented solid, at 45°C. The present process allowed the use of residual feedstock without the need of any pre-treatment. The direct application of the fermented solid to the esterification reaction avoided steps of enzyme recovery and immobilization. Altogether, these factors contribute to the reduction of the costs related to the biodiesel productions using lipases.

Keywords: biodiesel, hydroesterification, soybean soapstock acid oil, lipases, *Burkholderia cepacia*, solid-state fermentation, packed-bed reactor

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| FIGURA 1 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES | 21 |
| FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE..... | 22 |
| FIGURA 3 - ESQUEMA ESTRUTURAL DA LIPASE de <i>Burkholderia cepacia</i> | 25 |
| FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CONFORMAÇÃO ABERTA DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> | 26 |
| FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE REFINO DE ÓLEOS VEGETAIS | 35 |
| FIGURA 6 - REAÇÕES DE SÍNTESE DO BIODIESEL..... | 37 |
| FIGURA 7 - ETAPAS DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO..... | 38 |
| FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DO TRABALHO | 55 |
| FIGURA 9 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS EM ÁGUA SUBCRÍTICA..... | 56 |
| FIGURA 10 - SECADOR EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO UTILIZADO PARA SECAGEM DE SÓLIDO FERMENTADO | 64 |
| FIGURA 11 - REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL | 68 |
| FIGURA 12 - ESQUEMA EXPERIMENTAL DO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | 71 |
| FIGURA 13 - PERFIL DAS ATIVIDADES DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 DURANTE O CULTIVO..... | 95 |
| FIGURA 14 - EFEITO DA SECAGEM NA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | 96 |
| FIGURA 15 - CINÉTICA DA SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO | 97 |
| FIGURA 16 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO SECO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 DURANTE O ARMAZENAMENTO..... | 98 |
| FIGURA 17 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS PUROS E EM MEIOS REACIONAIS DE SÍNTESE ... | 100 |
| FIGURA 18 - EFEITO DA QUANTIDADE DE SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO . | 103 |
| FIGURA 19 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 FRENTE A DIFERENTES TRIACILGLICERÓIS | 104 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 20 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 FRENTE A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS LIVRES | 105 |
| FIGURA 21 - EFEITO DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO | 107 |
| FIGURA 22 - EFEITO DA VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO NA CONVERSÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO..... | 108 |
| FIGURA 23 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO | 110 |
| FIGURA 24 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM FRASCOS AGITADOS | 115 |
| FIGURA 25 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO | 118 |
| FIGURA 26 - FRAÇÃO MOLAR DOS COMPONENTES NA MISTURA GLOBAL E NAS FASES ORGÂNICA E AQUOSA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO | 121 |
| FIGURA 27 - SORÇÃO DA MISTURA REACIONAL NO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO..... | 123 |
| FIGURA 28 - SORÇÃO DOS COMPONENTES HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS NO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO | 124 |
| FIGURA 29 - SORÇÃO ESTIMADA DOS COMPONENTES DA MISTURA REACIONAL NO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO..... | 125 |
| FIGURA 30 - SEPARAÇÃO DAS FASES DA MISTURA REACIONAL NO EQUILÍBRIO | 127 |
| FIGURA 31 - EFEITO DA SORÇÃO DOS COMPONENTES HIDROFÍLICOS NO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NA CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO | 128 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E METÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASES | 43 |
| TABELA 2 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS POR HIDROESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASES..... | 46 |
| TABELA 3 - DADOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES | 53 |
| TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO..... | 59 |
| TABELA 5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ÁGUA NA CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO..... | 72 |
| TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS MATÉRIAS GRAXAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO | 86 |
| TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDAS POR HIDRÓLISE EM ÁGUA SUBCRÍTICA..... | 87 |
| TABELA 8 - ATIVIDADES DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 E <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM..... | 89 |
| TABELA 9 - PRODUTIVIDADES EM ÉSTER DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 E <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM..... | 91 |
| TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO BAGAÇO DE CANA <i>IN NATURA</i> | 92 |
| TABELA 11 - ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 OBTIDO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DO SÓLIDO | 93 |
| TABELA 12 - ATIVIDADES DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 PRODUZIDO EM DIFERENTES TAMANHOS DE FRASCOS..... | 101 |
| TABELA 13 - ESTUDOS DE REUTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS DO GÊNERO <i>Burkholderia</i> | 111 |
| TABELA 14 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL COM APLICAÇÃO DIRETA DE SÓLIDOS FERMENTADOS E CÉLULAS INTEIRAS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA | 114 |
| TABELA 15 - DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS DE CONVERSÕES DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO | 119 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------------|--|
| AGL | Ácido graxo livre |
| ANP | Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| AOCS | <i>American Oil Chemist's society</i> |
| C ₀ , C _t | Concentração dos AGLs no tempo da reação (mmol L ⁻¹) |
| ca | Coeficiente angular |
| CBMAI | Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria |
| CCD | Cromatografia de camada delgada |
| CEPPA | Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos |
| CPQBA | Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas |
| DIC | Detector de ionização de chama |
| E _{KF} | Equivalente em água do reagente de Karl Fischer (5 mg mL ⁻¹) |
| f | Fator de correção de solução titulante padronizada |
| FAO | <i>Food and Agricultural Organization of United Nations</i> |
| FES | Fermentação em estado sólido |
| F _{pH} | Fator de correção da dissociação parcial dos substratos |
| FS | Fermentação submersa |
| gSS | Gramas de sólido fermentado seco |
| IA | Índice de acidez |
| IS | Índice de saponificação |
| LB | Luria Bertani (meio de cultura) |
| LipBC | Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> |
| Log P | logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico |
| LTEB | Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise |
| N _{AGL} | Número de mols de ácido graxo livre |
| MM _{AGL} | Massa molar do ácido graxo livre |
| MM _{KOH} | Massa molar do hidróxido de potássio |

| | |
|-----------------|---|
| M _{SF} | Massa de sólido fermentado (base seca) |
| NPDEAS | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável |
| OGR | Óleo de gordura residual |
| P _E | Produtividade em éster (mg _E gSS ⁻¹ h ⁻¹) |
| PNPB | Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel |
| pNPP | Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| RFA | <i>Renewable Fuels Association</i> |
| SFBC | Sólido fermentado de <i>Burkholderia cepacia</i> |
| SFRM | Sólido fermentado de <i>Rhizopus microsporus</i> |
| SLC | Sistema livre de co-solvente |
| TAG | Triacilglicerol |
| U | Unidades de atividade enzimática (μmol min ⁻¹) |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| UNIFAC | <i>Universal Functional Activity Coefficient</i> |
| X | Conversão em éster (%) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 21 |
| 3.1 | DEFINIÇÃO DE LIPASES..... | 21 |
| 3.2 | FONTES DE LIPASES..... | 23 |
| 3.2.1 | Lipases da bactéria <i>Burkholderia cepacia</i> | 24 |
| 3.3 | PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS | 27 |
| 3.4 | UTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM SÍNTESE DE ÉSTERES..... | 30 |
| 3.5 | BIODIESEL | 33 |
| 3.5.1 | Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel | 33 |
| 3.5.2 | Tecnologias para produção de biodiesel | 36 |
| 3.6 | PRODUÇÃO DE ÉSTERES DO BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS | 40 |
| 3.6.1 | Sistemas reacionais utilizados na síntese de ésteres do biodiesel catalisada por lipases | 40 |
| 3.6.2 | Produção de ésteres do biodiesel por transesterificação e esterificação utilizando lipases | 42 |
| 3.6.3 | Produção de ésteres do biodiesel por hidroesterificação utilizando lipases | 45 |
| 3.6.4 | Reatores com enzimas imobilizadas para síntese do biodiesel | 48 |
| 3.7 | ESTUDOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA..... | 51 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 55 |
| 4.1 | PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR HIDRÓLISE DE MATÉRIAS GRAXAS EM ÁGUA SUBCRÍTICA..... | 56 |
| 4.2 | PRODUÇÃO DAS LIPASES | 57 |
| 4.2.1 | Micro-organismos e manutenção..... | 57 |
| 4.2.2 | Composição e preparo dos substratos sólidos | 58 |
| 4.2.3 | Fermentação em estado sólido de <i>Rhizopus microsporus</i> | 59 |
| 4.2.4 | Fermentação em estado sólido de <i>Burkholderia cepacia</i> | 60 |
| 4.2.5 | Delipidação do sólido fermentado..... | 60 |
| 4.2.6 | Comparação entre os sólidos fermentados de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Rhizopus microsporus</i> | 61 |
| 4.3 | ESTUDOS COM O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> | 62 |
| 4.3.1 | Efeito do tamanho das partículas do biocatalisador na atividade do sólido fermentado..... | 62 |
| 4.3.2 | Efeito da secagem do sólido fermentado..... | 63 |
| 4.3.3 | Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento | 65 |
| 4.3.4 | Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco em meio reacional de síntese | 65 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.5 | Produção do sólido fermentado em diferentes tamanhos de frascos | 66 |
| 4.4 | SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> | 66 |
| 4.4.1 | Efeito da quantidade de sólido fermentado na reação de esterificação | 66 |
| 4.4.2 | Atividade do sólido fermentado frente a diferentes substratos em reações de hidrólise e de esterificação | 66 |
| 4.5 | ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO | 67 |
| 4.5.1 | Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação | 69 |
| 4.5.2 | Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação | 69 |
| 4.6 | ESTUDO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO E DE FASES..... | 70 |
| 4.6.1 | Determinação dos componentes na mistura reacional global e nas fases orgânica e aquosa.. | 71 |
| 4.6.2 | Influência da agitação e do teor de água na conversão de equilíbrio de reações de esterificação em reator de leito fixo..... | 72 |
| 4.6.3 | Cálculo do equilíbrio termodinâmico | 73 |
| 4.7 | MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 74 |
| 4.7.1 | Determinação da umidade dos substratos sólidos | 74 |
| 4.7.2 | Determinação da atividade de hidrólise por método titulométrico | 74 |
| 4.7.3 | Determinação da atividade de esterificação | 75 |
| 4.7.4 | Determinação de ácidos graxos livres por método colorimétrico | 76 |
| 4.7.4.1 | Cálculo da conversão em éster em reações em presença de co-solvente | 77 |
| 4.7.5 | Determinação dos ácidos graxos livres e do índice de acidez por titulação ácido-base | 77 |
| 4.7.5.1 | Cálculo da conversão em éster em reações livres de co-solvente..... | 78 |
| 4.7.6 | Determinação do índice de iodo | 79 |
| 4.7.7 | Determinação do índice de saponificação | 80 |
| 4.7.8 | Quantificação de água por Karl-Fischer | 81 |
| 4.7.9 | Cromatografia em camada delgada..... | 81 |
| 4.7.10 | Cromatografia gasosa..... | 82 |
| 4.7.10.1 | Determinação do perfil de ácidos graxos | 82 |
| 4.7.10.2 | Quantificação dos etil-ésteres | 83 |
| 4.7.10.3 | Quantificação do etanol | 84 |
| 4.8 | TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS | 85 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 86 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE EM ÁGUA SUBCRÍTICA..... | 86 |
| 5.2 | SELEÇÃO DO MICRO-ORGANISMO PRODUTOR DE LIPASE | 88 |
| 5.2.1 | Produção dos sólidos fermentados..... | 89 |
| 5.2.2 | Comparação entre os sólidos fermentados de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Rhizopus microsporus</i> na síntese de ésteres etílicos..... | 90 |
| 5.3 | ESTUDOS COM O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> | 92 |
| 5.3.1 | Efeito do tamanho das partículas do biocatalisador na atividade de esterificação | 92 |
| 5.3.2 | Cinética da produção do sólido fermentado com atividade lipolítica | 94 |
| 5.3.3 | Efeito da secagem do sólido fermentado..... | 95 |

| | | |
|-----------------------|---|------------|
| 5.3.4 | Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento | 97 |
| 5.3.5 | Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco em meio reacional de síntese | 99 |
| 5.3.6 | Produção do sólido fermentado em diferentes tamanhos de frascos | 100 |
| 5.4 | SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia cepacia</i> SISTEMA LIVRE DE CO-SOLVENTE | 102 |
| 5.4.1 | Efeito da quantidade de sólido fermentado na reação de esterificação | 102 |
| 5.4.2 | Atividade do sólido fermentado frente a diferentes substratos em reações de hidrólise e de esterificação | 103 |
| 5.5 | ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO | 105 |
| 5.5.1 | Efeito da temperatura..... | 106 |
| 5.5.2 | Efeito da vazão de recirculação da mistura reacional através do leito fixo | 108 |
| 5.5.3 | Reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação..... | 110 |
| 5.5.4 | Produtividade da reação de esterificação..... | 113 |
| 5.5.5 | Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação | 115 |
| 5.6 | ESTUDO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO | 116 |
| 5.6.1 | Efeito da razão molar na conversão de equilíbrio | 117 |
| 5.6.2 | Determinação dos componentes na mistura reacional global e nas fases orgânica e aquosa | 119 |
| 5.6.3 | Sorção dos componentes da mistura reacional no sólido fermentado | 122 |
| 5.6.4 | Alteração do estado de equilíbrio da reação | 126 |
| 6 | CONCLUSÕES | 131 |
| 7 | PERSPECTIVAS..... | 132 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 133 |
| ANEXO..... | 144 | |
| A. | CÁLCULO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO..... | 144 |
| APÊNDICES..... | 150 | |
| A. | CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE LOWRY-TINSLEY..... | 150 |
| B. | CROMATOGRAMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO ÁCIDO DA BORRA DE SOJA | 151 |
| C. | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETIL-ÉSTERES POR CROMATOGRAFIA GASOSA..... | 153 |
| D. | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA..... | 155 |
| E. | ARTIGO..... | 156 |

1 INTRODUÇÃO

A busca por ésteres de ácidos graxos tem sido bastante intensificada nos últimos anos, devido à possibilidade de aplicação destes compostos em diversos setores industriais, como na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e mais recentemente, na indústria de biocombustíveis para produção de biodiesel. O biodiesel é uma alternativa para substituição dos combustíveis de origem fóssil, e tem como principais componentes os ésteres obtidos a partir de álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) e misturas de ácidos graxos de cadeia longa (ácidos palmítico, oleico, linoleico, esteárico) derivados de óleos vegetais, principalmente o óleo de soja. Além dos óleos vegetais, ésteres do biodiesel podem ser obtidos a partir de gordura animal, gorduras provenientes de esgotos, óleos residuais de frituras de procedência doméstica, comercial ou industrial, e borras ácidas provenientes do processo de refino de oleaginosas. Como a matéria-prima representa 50 a 85% do custo total de produção do biodiesel, o uso de matérias-primas residuais de baixo custo é indicado para tornar o custo deste biocombustível competitivo contra o diesel de origem fóssil (CHEN et al., 2009; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009).

A síntese do biodiesel em processos industriais já estabelecidos é normalmente feita por transesterificação alcalina, devido aos altos rendimentos (acima de 95%) obtidos em um tempo curto de reação (até 1 h). No entanto, este processo requer o uso de fontes de triacilgliceróis (TAGs) com baixo teor de ácidos graxos livres (AGLs) ($< 1\%$) e umidade ($< 0,5\%$), impedindo o uso de matérias-primas de baixo custo, que contêm quantidades significantes de AGLs e água. AGLs consomem o catalisador alcalino, formando sabão, e a água pode hidrolisar os TAGs, diminuindo o rendimento da reação. Além disso, o sabão emulsiona os produtos, dificultando o processo de recuperação do biodiesel (BANKOVIC-ILIC; STARNENKOVIC; VELJKOVIC, 2012).

O processo de hidroesterificação envolve uma etapa de hidrólise seguida de esterificação, e é uma alternativa vantajosa ao processo convencional de transesterificação. Neste processo, todos os TAGs são convertidos em AGLs, o que independe da acidez e da umidade inicial do material de origem. Em seguida, o material obtido é submetido a um processo de esterificação. Com isso, é possível

obter altos rendimentos em monoésteres totalmente livres de glicerol, já que este componente é removido na etapa preliminar de hidrólise. As etapas de hidrólise dos TAGs e esterificação dos AGLs podem ser catalisadas por via química ou por via enzimática, ou ainda pela combinação das duas vias.

A catálise enzimática para a síntese de biodiesel utilizando lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) possui diversas vantagens que estão relacionadas à utilização de condições brandas, biodegradabilidade do catalisador e redução do volume de efluentes resultantes do processo de purificação do biodiesel. No entanto, fatores ligados ao alto custo de produção de enzimas e sua baixa estabilidade nos meios reacionais de síntese, e ainda altos tempos de reação dos processos biocatalisados, limitam a utilização dos processos enzimáticos. Estes fatores podem ser minimizados através de técnicas de imobilização de lipases em suportes sólidos, que possibilitam o aumento da atividade catalítica e da estabilidade em meio orgânico, permitindo ainda a reutilização do biocatalisador. Outra possibilidade interessante é a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES). Neste sistema, a lipase produzida permanece imobilizada naturalmente sobre o sólido fermentado, podendo ser utilizada em reações sem a necessidade de extração e posterior imobilização, o que contribui para diminuir os seus custos de produção e purificação. Além disso, é possível utilizar resíduos agroindustriais como suporte sólido, que são de baixo custo e contribuem para a minimização dos impactos ambientais.

A maioria dos estudos de síntese de ésteres catalisada por lipases imobilizadas são feitos em reatores agitados. No entanto, as enzimas imobilizadas atuam como catalisadores em meio heterogêneo, sendo mais indicado o uso de reatores de leito fixo, devido à sua maior eficiência, à possibilidade de reutilização da enzima, à minimização dos danos do biocatalisador, e, consequentemente, menor custo operacional. O uso de co-solventes hidrófóbicos em catálise enzimática tem sido muito difundido, pois estes aumentam a solubilidade dos substratos e geralmente também aumentam a estabilidade da enzima. Por outro lado, processos de síntese do biodiesel realizados em sistema livre de co-solvente (SLC) são recomendados para viabilizar a aplicação industrial de lipases.

Com base nisto, a proposta geral deste trabalho foi o desenvolvimento do processo de esterificação etílica enzimática com sólido fermentado em reator de leito fixo em ausência de co-solvente. Inicialmente, foi selecionado um sólido fermentado,

produzido por FES com microrganismos produtores de lipases, com maior capacidade de esterificação etílica em meio livre de co-solvente. Após seleção do sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* LTEB11, este foi utilizado diretamente em reações de esterificação com diferentes substratos. Os substratos consistiram em misturas de ácidos graxos livres obtidas por hidrólise de gorduras de baixo custo em água subcrítica, como o óleo ácido da borra de soja, sebo de graxaria e óleo residual proveniente de caixa de gordura de restaurante. Finalmente, para um melhor entendimento do processo, foi feito um estudo aprofundado da reação de esterificação em reator de leito fixo, em relação à composição das fases formadas no sistema bifásico, sorção dos componentes da reação no sólido fermentado e conversão no equilíbrio termodinâmico.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento do processo de esterificação etílica por catálise enzimática em reator de leito fixo preenchido com sólido fermentado contendo lipases e misturas de ácidos graxos obtidas por hidrólise em água subcrítica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar diferentes misturas de ácidos graxos obtidas por hidrólise em água subcrítica de matérias-primas de baixo custo, tais como o óleo ácido da borra de soja, óleo de gordura residual e sebo bovino;
- Selecionar o micro-organismo produtor de lipase, dentre os que, reconhecidamente, têm capacidade de síntese de ésteres disponíveis no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR);

- Caracterizar o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 (SFBC), avaliando:
 - o efeito do tamanho das partículas do sólido fermentado na atividade de esterificação;
 - o efeito do método de secagem;
 - a estabilidade do sólido fermentado seco ao armazenamento e em meio reacional de síntese;
 - a atividade do sólido fermentado seco frente a diferentes substratos em reações de hidrólise e de esterificação;
- Otimizar a síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo preenchido com o sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 em sistema livre de co-solvente, avaliando:
 - o efeito da temperatura e da vazão de recirculação da mistura reacional através do leito fixo;
 - a capacidade de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação;
 - o efeito da razão molar dos substratos;
- Estudar o equilíbrio da reação de esterificação através da:
 - comparação da conversão de equilíbrio experimental com a calculada por modelo termodinâmico;
 - determinação da composição dos componentes nas fases orgânica e aquosa formadas no sistema reacional bifásico e a sorção dos componentes no sólido fermentado durante a reação;
 - avaliação do efeito da adição de água e da sorção dos componentes hidrofílicos (água e etanol) no sólido fermentado, na conversão de equilíbrio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEFINIÇÃO DE LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) são definidas classicamente como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de TAGs de cadeia longa (trioleína) (VERGER, 1997). Entretanto, lipases se destacam pela capacidade de catalisar não só reações de hidrólise, mas também síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, transesterificação (alcoólise, acidólises) e interesterificação (Figura 1) (RHEE et al., 2005; KRIEGER et al., 2004; VILLENEUVE et al., 2000; JAEGER; REETZ, 1998).

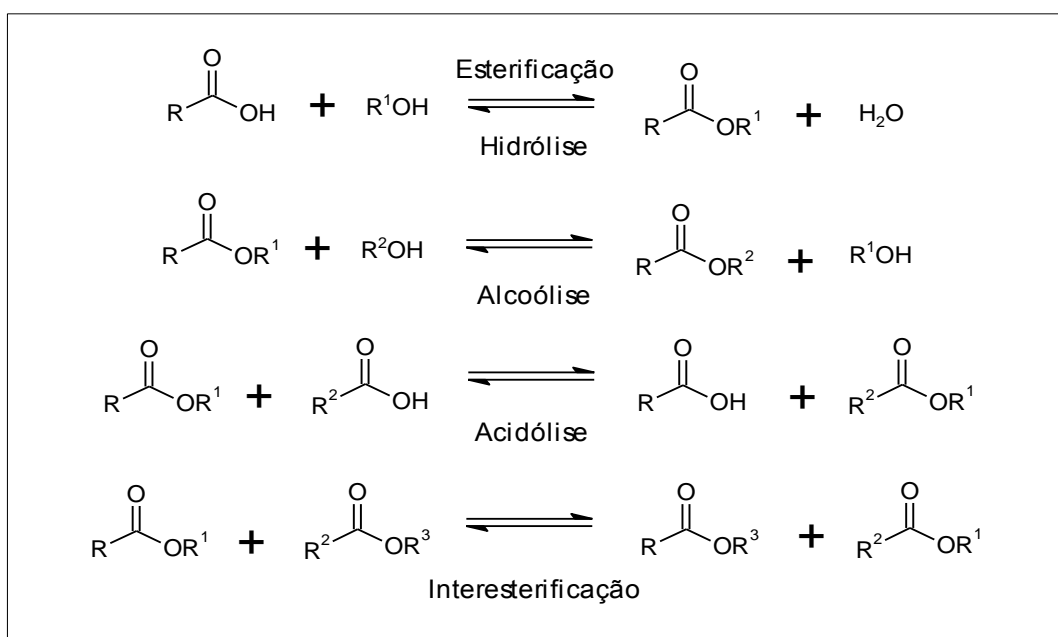


FIGURA 1 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases classificadas como serina hidrolases, que são constituídas por uma tríade catalítica, composta normalmente pelos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina.

O dobramento das lipases é do tipo α/β hidrolase, que apresenta um núcleo central formado por uma folha β central, consistindo de oito diferentes fitas β anti-paralelas ($\beta 1$ - $\beta 8$), conectadas por cinco α -hélices (A-F) (Figura 2) (BORNSCHEUER, 2002; POUDEROYEN et al., 2001). O nucleófilo catalítico (serina) encontra-se em um pentapeptídeo conservado com uma sequência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly) localizada no lado C-terminal da fita 5, onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos (SCHRAG; CYGLER, 1997; JAEGER et al., 1994).

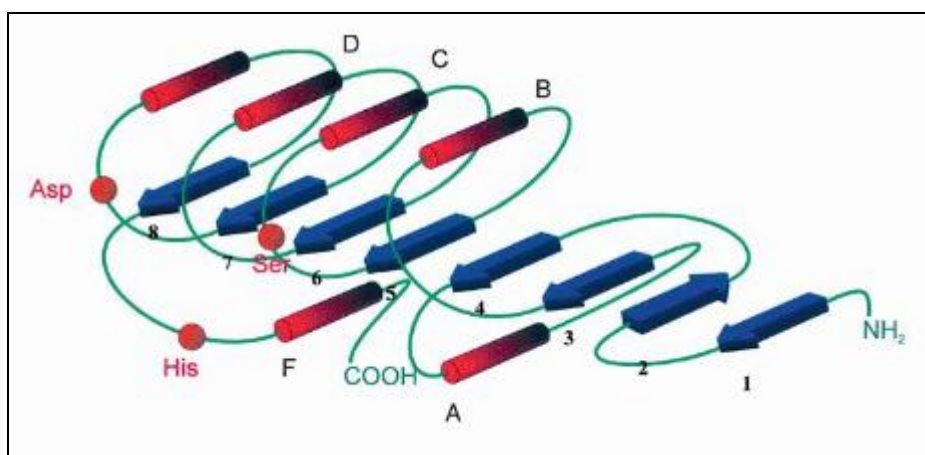


FIGURA 2 - MODELO ESTRUTURAL DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE

As folhas β são representadas pelas setas azuis (1 – 8) e as α -hélices pelos bastões vermelhos (A-F). Os resíduos His-Ser-Asp que formam a tríade catalítica estão representados pelas esferas vermelhas. FONTE: BORNSCHEUER (2002).

O sítio ativo da maioria das lipases é protegido por uma cadeia peptídica hidrofóbica denominada *flap* ou *lid* (tampa). Em meios aquosos, sem um substrato hidrofóbico, a *lid* cobre o sítio catalítico da lipase, que fica inativo. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, ocasionando mudanças na sua estrutura, expondo o sítio ativo e ativando a enzima. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces óleo/água é conhecida como “ativação interfacial”. A presença da *lid* na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial já foram fatores determinantes para a caracterização de lipases. Entretanto, foi constatado que a presença da *lid* não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, como demonstrado, por

exemplo, para as cutinases, que não apresentam a *lid* e exercem atividade hidrolítica sem ativação interfacial (CYGLER; SCHRAG, 1997). Por outro lado, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B possuem a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998). Assim, a presença da *lid* e o fenômeno da ativação interfacial, ao contrário do que se considerava há alguns anos, não são critérios adequados para classificar uma enzima como lipase.

Outro critério utilizado para classificar lipases, e o mais aceito atualmente, é a especificidade preferencial pelo substrato, que diferencia uma lipase de uma esterase. Os substratos naturais para lipases são TAGs constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, tendo-se a trioleína como substrato padrão, enquanto que as esterases hidrolisam ligações ésteres únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar. Sendo assim, as lipases têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam TAGs de cadeia longa (trioleína). Deve-se enfatizar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (JAEGER; REETZ, 1998; VERGER, 1997).

3.2 FONTES DE LIPASES

Lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de plantas, animais e micro-organismos naturais ou geneticamente modificados, que as produzem de forma endógena, podendo ser excretadas ou não.

As bactérias e os fungos são micro-organismos produtores de lipases e da maioria das enzimas com aplicação biotecnológica, devido ao rápido crescimento, à facilidade de manipulação genética, e à maior estabilidade e segurança durante a produção destes micro-organismos, comparados às plantas e animais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; REETZ, 1998).

As características e as propriedades físico-químicas das lipases microbianas apresentam muita heterogeneidade, como especificidade em presença de diferentes substratos, estabilidade em pH, temperatura e solventes orgânicos. Estas propriedades variam entre os gêneros e até entre as isoformas produzidas pelo mesmo micro-organismo. A comparação entre as propriedades de diferentes lipases

é complicada, devido à falta de padronização das metodologias utilizadas (FORESTI; FERREIRA, 2005).

A especificidade é um fator decisivo na escolha de uma lipase, pois está relacionada com as propriedades moleculares da enzima, com a estrutura do substrato e com fatores que afetam a ligação enzima-substrato. A especificidade da enzima pode ser classificada em relação: (a) ao substrato - uma enzima apresenta diferentes velocidades de reação de hidrólise entre triacil-, diacil- e monoacilgliceróis; (b) à regiosseletividade - as enzimas hidrolisam ligações ésteres de acordo com a posição na molécula, podendo ser *sn*-1,3 ou *sn*-1,2 específicas, ou aleatoriamente em qualquer ligação (não específicas); (c) aos ácidos graxos que compõem o substrato - preferência por ácidos graxos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação específicos; (d) à estereosseletividade - discriminação entre enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases podem também ser não seletivas ou apresentar a combinação de mais de um tipo de especificidade (JENSEN; GALLUZZO; BUSH, 1990).

3.2.1 Lipases da bactéria *Burkholderia cepacia*

B. cepacia, anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia*, é uma bactéria gram-negativa, e pode ser encontrada no solo, na água, associada com plantas ou como agentes infecciosos em animais e humanos. Esta bactéria é uma espécie pertencente ao complexo *B. cepacia* (Bcc), composto por mais 16 espécies denominadas: *B. multivorans*, *B. dolosa* (VANDAMME et al., 1997), *B. cenocepacia* (VANDAMME et al., 2003), *B. stabilis* (VANDAMME et al., 2000), *B. vietnamiensis* (VERMIS et al., 2004), *B. ambifaria* (COENYE et al., 2001), *B. anthina* e *B. pyrrocinia* (VANDAMME et al., 2002), *B. ubonensis*, *B. latens* sp. nov., *B. diffusa* sp. nov., *B. arboris* sp. nov., *B. seminalis* sp. nov., *B. metallica* sp. nov. (VANLAERE et al., 2008); *B. lata* e *B. contaminans* (VANLAERE et al., 2009).

A lipase de *B. cepacia* é composta por uma cadeia polipeptídica de 320 resíduos de aminoácidos, com massa molar de 33 kDa. A estrutura terciária da enzima (Figura 3), obtida por homologia com as bactérias *Pseudomonas glumae* e *Chromobacterium viscosum*, possui um domínio maior e dois menores. O domínio

maior (C) consiste de seis fitas β centrais paralelas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ e $\beta 6$), ladeadas por duas α -hélices de um lado ($\alpha 1$ e $\alpha 11$) e quatro α -hélices do outro ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ e $\alpha 10$). O segundo domínio (U1) é composto de três α hélices ($\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$) e o terceiro domínio (U2) consiste de duas fitas β antiparalelas ($\beta 3$ e $\beta 4$) e duas α -hélices ($\alpha 8$ e $\alpha 9$). O sítio ativo da enzima formado pela tríade catalítica é composto por três resíduos (Ser⁸⁷, His²⁸⁶ e Asp²⁶⁴) localizados na região C-terminal da folha β central, e são idênticos aos de outras enzimas α/β hidrolases (KIM et al., 1997; SCHRAG et al., 1997).

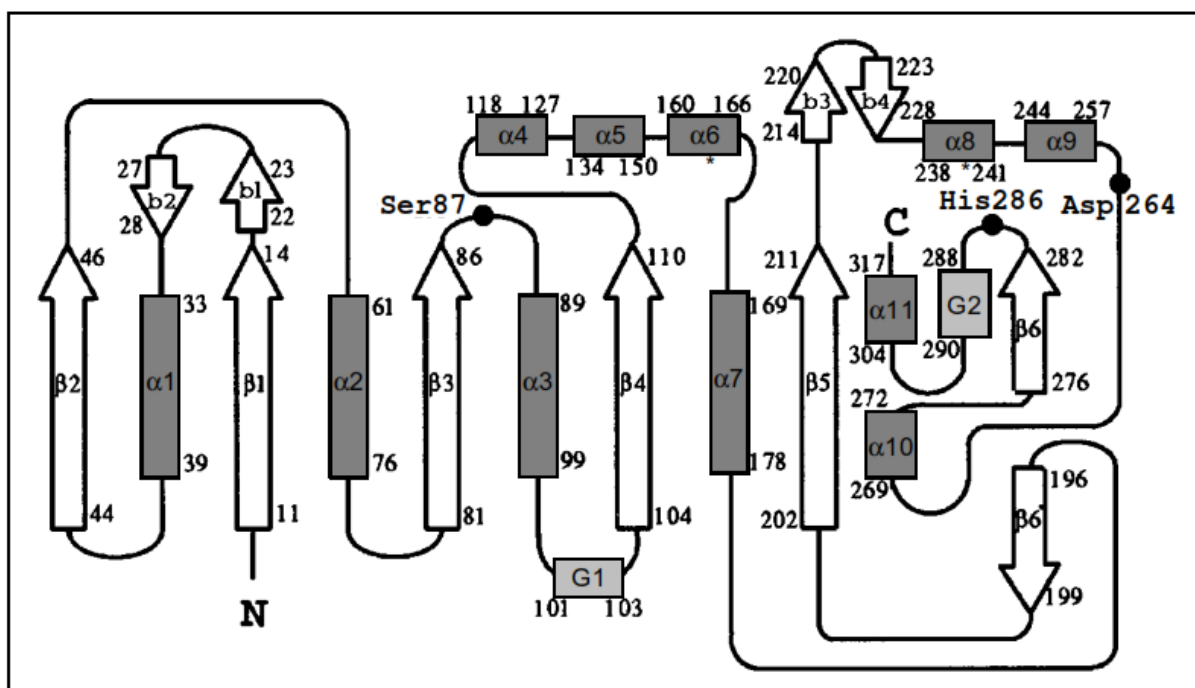


FIGURA 3 – ESQUEMA ESTRUTURAL DA LIPASE de *Burkholderia cepacia*

As fitas β estão representadas por flechas e as α -hélices por retângulos. Os três resíduos da tríade catalítica, Ser⁸⁷, Asp²⁸⁴ e His²⁸⁶ estão representados por círculos pretos.

FONTE: KIM et al. (1997)

A Figura 4 ilustra uma representação da estrutura tridimensional da lipase de *B. cepacia* LPSA001526 (Amano Pharmaceutical Company, Nagoya, Japão), onde a tríade catalítica está representada em vermelho e o sítio de ligação do íon cálcio em amarelo. Acredita-se que o sítio de ligação do íon cálcio seja responsável pela estabilidade da tríade catalítica. Estudos mostram que a conformação aberta da

lipase de *B. cepacia* é favorecida em solventes hidrofóbicos e na presença de uma interface lipídeo/água, enquanto que em meio aquoso a conformação fechada é favorecida, indicando que esta lipase possui o mecanismo de ativação interfacial (KIM et al., 1997; SCHRAG et al., 1997).

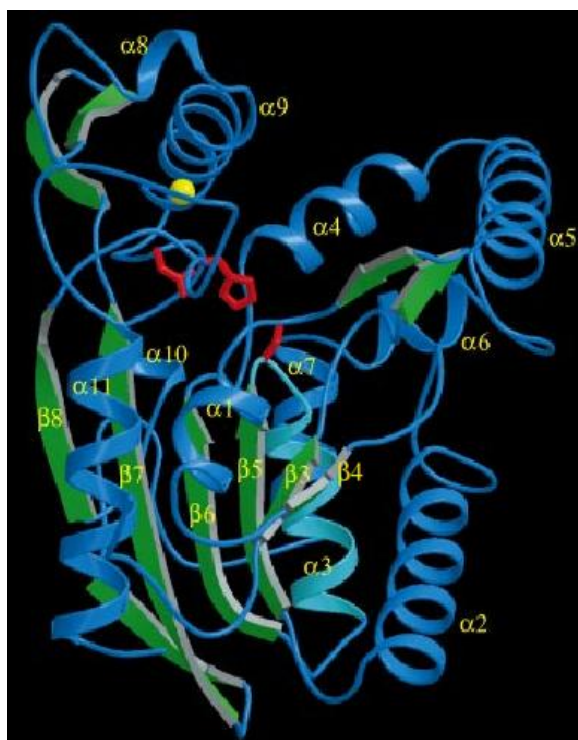


FIGURA 4 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CONFORMAÇÃO ABERTA DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LPSA001526

As fitas β estão representadas em verde e as α -hélices em azul. A posição do íon Ca^{2+} está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão indicados em vermelho.

FONTE: SCHRAG et al. (1997)

A cepa *B. cepacia* LTEB11 utilizada neste trabalho, anteriormente identificada como *Bacillus megaterium*, produz uma lipase (LipBC) com massa molecular de aproximadamente 33 kDa. Em estudos de estabilidade, 100% da atividade inicial desta lipase foi mantida após incubação por 1 h em isopropanol, butanol, tolueno, *n*-hexano e *n*-heptano. A temperatura para máxima atividade lipolítica foi de 55°C, na faixa de pH entre 6 a 8 (LIMA et al., 2004).

Outros estudos foram feitos com LipBC imobilizada em polipropileno altamente poroso (Accurel EP100 e Accurel MP1000) em reações em frascos

agitados. Em estudos de síntese do oleato de etila, foram obtidos 95 a 100% de conversão em 1 a 3 h de reação em meio reacional contendo 450 mg de LipBC imobilizada, 210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico em 5 mL de *n*-heptano, a 37°C e 200 rpm (BARON et al., 2011; SALUM et al., 2008). Em outro estudo, foram obtidos 96% de conversão na transesterificação do óleo de mamona em 8 h, em meio reacional contendo 150 mg de LipBC imobilizada, 9 mmol de etanol e 3 mmol de óleo de mamona, a 45°C e 300 rpm (BARON et al., 2014). Bons resultados foram obtidos também em reações de transesterificação para resolução de misturas racêmicas de álcoois alílicos secundários, onde foram obtidos na transesterificação de (*R,S*)-*p*-clorofenilprop-2-en-1-ol com vinil acetato elevados valores de enantiosseletividade (E_{RS} -110), a 29°C e 180 rpm (MOURE et al., 2013).

3.3 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas microbianas são tradicionalmente obtidas por fermentação submersa (FS), mas a técnica de fermentação em estado sólido (FES) vem sendo bastante pesquisada nos últimos anos (LIU et al., 2013; ALBERTON et al., 2010; SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010; SINGHANIA et al., 2009; NAGY et al., 2006; PANDEY et al., 1999). Industrialmente, FS é o processo mais utilizado para a produção de lipases e outras enzimas, onde se utiliza um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. A técnica de FS possui facilidade de cultivo em grande escala, pois os fermentadores possuem agitadores que garantem homogeneidade do meio, o que facilita o controle dos parâmetros do processo (SCHMIDEL et al.; 2001).

No processo de FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, com quantidades mínimas de água livre, de forma que os espaços entre as partículas sólidas são preenchidos com uma fase contínua gasosa e um mínimo de água livre, facilitando o processo de transferência de oxigênio. Os metabólitos são produzidos em uma forma concentrada facilitando seu processo de recuperação do meio de fermentação. O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e excretando enzimas e metabólitos

(MITCHELL et al., 2006; PANDEY, 2003). Como substratos, podem ser utilizados substratos sólidos naturais, como resíduos agroindustriais, ou suportes inertes, como poliuretano e perlite (MARTINEZ-RUIZ et al., 2008; PANDEY, 2003).

Os principais resíduos que podem ser utilizados como substratos em FES, para a produção de lipases, são as tortas originadas dos processos de extração do óleo de sementes (milho, girassol e soja) e bagaços da indústria de processamento do amido, da cana-de-açúcar ou de cítricos (KRISHNA, 2005). Segundo dados da *Food and Agricultural Organization of United Nations* (FAO), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por 38% da produção em 2012. Neste ano, o Brasil processou cerca de 671 milhões de toneladas de cana, que geraram aproximadamente 167 milhões de toneladas de bagaço (FAO, 2013). Devido à grande quantidade produzida e às suas características físico-químicas, esse material tem sido utilizado como matéria-prima na geração de biomassa para energia elétrica, na fabricação de papel, papelão e aglomerados, entre outras aplicações (CHANDEL et al., 2012; PANDEY et al., 2000). Mais recentemente, bagaço de cana puro ou em misturas tem sido utilizado para FES no LTEB para a produção de lipases (BOTTON et al., 2013; RASERA et al., 2012; ALBERTON et al., 2010; SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010), pectinases (STOCK, 2013; BIZ, 2012) e de biossurfactantes (SLIVINSKI et al., 2012; KRIEGER, CAMILIOS NETO, MITCHELL, 2010).

A composição, as características físico-químicas, o custo, e a disponibilidade do substrato são fatores importantes na escolha do sólido para o processo de FES. Dentre as características do sólido, o tamanho das partículas (granulometria) e níveis de umidade são pontos críticos. Partículas pequenas de substrato fornecem uma grande superfície de contato com o micro-organismo, mas favorecem a compactação do sólido, impedindo a difusão de gases no meio. Por outro lado, partículas grandes favorecem a aeração, mas diminuem a área superficial do biocatalisador (PANDEY et al., 1999). Zago (2010) avaliou o efeito da moagem dos substratos (bagaço de cana enriquecido com farinha de semente de girassol), na atividade lipolítica do sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (SFRM). Neste estudo, foram encontradas atividades bastante diferentes de acordo com o tamanho da partícula de SFRM. As atividades de hidrólise das partículas menores (tamanho entre 0,4 a 1,0 mm) foram 63% maiores do que as atividades das partículas maiores (2,4 mm). Verificou-se também um aumento de

56% na atividade das partículas de SFRM trituradas em moinho de facas em relação ao SFRM não moído, que foi justificado pelo aumento da área superficial de SFRM após moagem.

No caso da umidade inicial do substrato sólido, a faixa de variação normalmente utilizada na FES é de 40 a 80% (em base seca). A quantidade ótima de água varia de acordo com o micro-organismo e do grau de absorção de água do substrato utilizado. Níveis elevados de umidade livre dificultam a transferência de gases entre as partículas do sólido, diminuindo o crescimento do micro-organismo, enquanto que níveis baixos de umidade diminuem a acessibilidade do micro-organismo aos nutrientes (PANDEY, 2003; MAHADIK et al., 2002).

De maneira geral, fungos são mais adequados ao crescimento no estado sólido do que as bactérias, devido à sua capacidade de tolerar ambientes com baixa atividade de água (SINGHANIA et al., 2009; COUTO; SANROMÁN, 2006). As bactérias necessitam de maior quantidade de água no meio de cultivo; no entanto, alguns trabalhos recentes têm provado que culturas bacterianas cultivadas por FES podem resultar em produções de lipases bastante ativas. Por exemplo, a lipase de *B. cepacia* LTEB11, utilizada neste trabalho, já foi produzida por FES em farelo de milho com 55% de umidade (m/m) enriquecido com 5% de óleo de milho, a 29°C por 72 h, obtendo-se uma atividade de hidrólise com palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) de 108 U gSS⁻¹ (unidades de atividade enzimática por grama de sólido seco) (FERNANDES et al., 2007). Mais tarde, Salum et al. (2010) continuaram os estudos e produziram SFBC a partir de uma mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol (1:1, m/m) com 75% de umidade (m/m), a 29°C por 96 h, e obtiveram maior atividade de hidrólise (234 U gSS⁻¹).

As vantagens da FES, quando comparada com a FS, são o baixo custo das matérias-primas empregadas no meio de cultivo (quando se utiliza resíduos agroindustriais), a simplicidade do meio de fermentação utilizado e a menor demanda energética (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). Castilho et al. (2000) realizaram uma análise econômica comparativa dos processos de FS e FES para a produção de lipases por *Penicillium restrictum*. Essa análise mostrou que para uma planta produzindo 100 m³ de concentrado de enzima por ano, o processo por FS requer um investimento de capital 78% maior do que o processo por FES. O custo do produto final produzido por FES seria 47% menor do que o preço de mercado para uma lipase similar. Além disso, o sólido fermentado pode ser utilizado

diretamente em reações, sem a necessidade de etapas de extração e imobilização da enzima.

Apesar das vantagens da produção de enzimas por FES, alguns fatores, como a falta de homogeneidade do meio e a dificuldade de medida e controle dos parâmetros de aeração, pH, temperatura e umidade, dificultam a produção de compostos de interesse em grande escala (COUTO; SANROMÁN, 2006). Além disso, durante a FES é gerada uma grande quantidade de calor metabólico, que pode afetar o crescimento do micro-organismo (MITCHELL et al., 2006; PANDEY, 2003). Devido a esses problemas relacionados à transferência de calor e de massa em biorreatores, a produção industrial de enzimas por FES ainda é um desafio a ser superado (MITCHELL et al., 2000; 1999).

3.4 UTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM SÍNTESE DE ÉSTERES

Alguns estudos têm sido relatados na literatura com aplicação direta de sólidos fermentados com atividade lipolítica em meios reacionais para síntese de ésteres (LIU et al., 2014; LIU et al., 2013; BOTTON et al., 2013; SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010; MARTINEZ-RUIZ et al., 2008; FERNANDES et al., 2007; NAGY et al., 2006).

Os primeiros estudos de aplicação direta de sólidos fermentados com atividade lipolítica em reações em meio orgânico foram feitos por Nagy et al. (2006) na resolução de misturas racêmicas de álcoois secundários. Mais tarde, Fernandes et al. (2007) e Salum et al. (2010) utilizaram pioneiramente em reações de esterificação e transesterificação um sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 (SFBC) liofilizado, produzido no LTEB conforme descrito anteriormente. Nos estudos de esterificação em frascos agitados, foram obtidos 94% de conversão em 18 h em meio reacional contendo 555 mg de SFBC, 350 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico (razão molar 5:1) em 5 mL de *n*-heptano (FERNANDES et al., 2007). Nos primeiros estudos de transesterificação, foram obtidos 95% de conversão em 120 h em meio reacional contendo 630 mg de SFBC, 420 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de óleo de milho (razão molar 6:1) em 5 mL de *n*-heptano, a 37°C e

200 rpm (FERNANDES et al., 2007). Conforme relatado anteriormente, Salum et al. (2010) otimizaram a FES e produziram um novo SFBC com o dobro da atividade obtida por Fernandes et al. (2007). Este sólido foi então utilizado em reações de transesterificação em SLC. Neste estudo foram obtidos 95% de conversão em 46 h de reação em reator de leito fixo preenchido com 3 g de SFBC e meio reacional contendo 72 mmol de etanol e 24 mmol de óleo de soja (razão molar 3:1) com vazão de recirculação de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, a 50°C (SALUM et al., 2010).

Mais recentemente, foram publicados estudos de aplicação de um sólido fermentado de *Burkholderia cenocepacia* em reações de etanolise do óleo de soja para produção de biodiesel (LIU et al., 2014; LIU et al., 2013). Nestes estudos, a FES foi realizada com uma mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol (5:3, m/m) enriquecida com 10% de azeite de oliva e com 75% de umidade (m/m), a 37°C por 96 h, obtendo-se uma atividade de hidrólise contra azeite de oliva de 72 U gSS^{-1} . Este sólido foi então utilizado em reações de transesterificação em meio reacional contendo 1,5 g de sólido fermentado por mL de meio, 2,8 g de etanol e 13 g de óleo de soja (razão molar 4:1) em *t*-butanol (20%, m/m). As reações foram feitas em frascos agitados a 200 rpm e 45°C , e foram obtidos 86% de conversão em 96 h de reação (LIU et al., 2013). Além disso, foi desenvolvido um modelo cinético baseado no mecanismo Ping Pong Bi Bi com inibição competitiva pelo etanol, que segundo os autores foi ajustado satisfatoriamente aos resultados (LIU et al., 2014).

Sólidos fermentados produzidos por fungos do gênero *Rhizopus* sp. também têm sido utilizados diretamente em reações de esterificação e transesterificação (BOTTON et al., 2013; ZAGO, 2010; MARTINEZ-RUIZ et al., 2008). Zago (2010) produziu um sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (SFRM) a partir de uma mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol (1:1, m/m) com 80% de umidade (m/m) na FES a 40°C por 18 h, e obteve atividade de hidrólise contra trioleína de 38 U gSS^{-1} . Em reações de esterificação em frascos agitados foram obtidos 98% de conversão em 3 h, em meio reacional contendo 2,2 g de SFRM, 210 mmol L^{-1} de etanol e 70 mmol L^{-1} de ácido oleico (razão molar 3:1) em 15 mL de *n*-heptano, a 30°C e 180 rpm. Em reações de transesterificação, em reator de leito fixo, contendo 3 g de SFRM, foram obtidos apenas 57% de conversão em 120 h, em meio reacional contendo 210 mmol L^{-1} de etanol e 70 mmol L^{-1} de óleo de milho (razão molar 3:1) em 50 mL de *n*-heptano, com vazão de recirculação de 2 mL min^{-1} , a 44°C . Em uma nova reação no reator de leito fixo, o co-solvente foi

retirado e a quantidade de substratos foi aumentada para 132 mmol de etanol e 44 mmol de óleo de milho, neste caso, para o mesmo tempo de reação, a conversão diminuiu para 28% (ZAGO, 2010).

Comparando os rendimentos da transesterificação, SFBC mostrou ser mais adequado do que SFRM em SLC. No entanto, Zago (2010) não otimizou os estudos em SLC. Recentemente, Botton et al. (2013) produziram um novo SFRM com atividade contra trioleína (102 U gSS^{-1}) 2,7 vezes maior que a obtida por Zago (2010). Este novo SFRM está sendo utilizado na síntese de oleato de etila em SLC. Neste estudo, já foram obtidos 98% conversão em 48 h em meio reacional contendo 1,6 g de SFRM (base seca), 300 mmol de etanol e 30 mmol de ácido oleico (razão molar 10:1), a 40°C e 200 rpm (BOTTON et al., 2013).

Em outro estudo, foi produzido um sólido fermentado de *Rhizopus* sp. a partir da FES do substrato inerte Perlite enriquecido com óleo de oliva, com 60% de umidade (m/m), a 45°C por 20 h, onde foi obtido uma atividade de hidrólise contra azeite de oliva de 75 U gSS^{-1} (MARTINEZ-RUIZ et al., 2008). Os autores obtiveram 100% de conversão em 60 min, em meio reacional contendo 1 g de sólido fermentado, 250 mmol L^{-1} de etanol e 50 mmol L^{-1} de ácido oleico (razão molar 5:1) em 9 mL de *n*-hexano, a 45°C . Outra aplicação de sólidos fermentados foi relatada para síntese de ésteres de geraniol, que são utilizados como aromas na indústria cosmética e de alimentos (ROMANO et al., 2007). Neste estudo, os autores produziram sólidos fermentados por *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* em cascas de arroz e utilizaram diretamente em reações de esterificação em *n*-heptano para a produção de éster de geraniol, obtendo-se conversões de 95% em 24 h.

Os resultados relatados indicam o potencial da aplicação direta de sólidos fermentados com atividade lipolítica na síntese de ésteres, principalmente ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, componentes do biodiesel. Vale ressaltar que a adição direta do sólido fermentado no meio reacional evita a necessidade de etapas adicionais de extração e imobilização da enzima e, portanto, tem potencial para reduzir o custo da síntese de biodiesel catalisada enzimaticamente.

3.5 BIODIESEL

A definição brasileira do biodiesel, de acordo com a Resolução nº 7, de 19/03/2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), determina que o biodiesel (B100)* é um “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais” (BRASIL, 2008). Outra definição, inserida com a Lei nº 11.097, de 13/01/2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, definiu o biodiesel como um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005).

Em 2004, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que tem como objetivo a implantação da produção de biodiesel de forma sustentável, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, contribuindo com a geração de emprego e renda. No ano seguinte, foi estabelecida a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado, conforme Lei nº 11.097, de 13/01/2005. Esta lei obrigou a adição de um percentual mínimo de 2% de biodiesel ao diesel até 2008 e de 5% até 2013 (BRASIL, 2005). O governo antecipou em três anos a mistura obrigatória de 5% de biodiesel ao diesel mineral (B5), entrando em vigor em 2010 e não em 2013 como estava previsto na lei.

3.5.1 Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel

Na prática, os ésteres alquílicos de ácidos graxos são obtidos principalmente por transesterificação alcalina de TAGs contidos em óleos ou gorduras de plantas ou

* O biodiesel pode ser usado misturado ao óleo diesel de petróleo em qualquer proporção. A concentração de biodiesel é informada por meio de uma nomenclatura específica, definida por "BX", onde X refere-se à porcentagem em volume do biodiesel ao qual é misturado ao diesel de petróleo. Assim, B5, B20 e B100 referem-se, respectivamente às misturas de biodiesel/diesel contendo 5, 20 e 100% de biodiesel.

animais, com álcoois primários de cadeia curta, como metanol e etanol (AKOH et al., 2007; KAIEDA et al., 2001).

O metanol é o álcool mais utilizado mundialmente para a produção de biodiesel, devido à maior reatividade, conferida pela sua maior polaridade, e menor custo em relação a outros álcoois primários de cadeia curta. No entanto, comparado ao etanol, este álcool é mais tóxico, tem maior risco de explosão e em caso de incêndio forma uma chama invisível, dificultando o controle do fogo. Além disso, o metanol é obtido principalmente a partir de gases derivados do petróleo, de origem fóssil não renovável (ANP, 2013). O etanol é obtido principalmente por fontes renováveis, sendo o grão do milho e a cana-de-açúcar as matérias-primas mais utilizadas. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, mas ainda utiliza principalmente o metanol na produção de biodiesel (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA, 2013).

Como fonte de ácidos graxos, a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil é o óleo de soja. Em 2012, este óleo foi responsável por 77,4% da produção de biodiesel, seguido da gordura animal com 16,8% e 5,8% provenientes de outras matérias-primas como as gorduras provenientes de esgotos, os óleos residuais de frituras e borras ácidas resultantes do refino de óleos vegetais (ANP, 2013). Uma das dificuldades de se utilizar materiais graxos residuais na síntese do biodiesel por transesterificação alcalina é a necessidade de o material de partida ter teores mínimos de AGLs (abaixo de 1%) e de água (abaixo de 0,5%), pois a presença de AGLs leva à formação indesejável de sabões e a presença de água pode levar à hidrólise dos TAGs (BANKOVIC-ILIC; STARNENKOVIC; VELJKOVIC, 2012; GERPEN, 2005; LOTERO et al., 2005). Devido a estes requisitos, o material de partida pode representar 50 a 85% do custo total do biodiesel; portanto, a escolha da matéria-prima é um fator que deve ser avaliado em relação ao custo, rendimento, qualidade e aproveitamento dos subprodutos (CHEN et al., 2009; CHISTI, 2007; MA; HANNA, 1999). Deste modo, a utilização de matérias graxas residuais é de interesse estratégico para redução do custo do biodiesel, além de possibilitar a reutilização de resíduos, o que contribui para a diminuição dos impactos ambientais.

Dentre os materiais graxos de baixo custo que podem ser utilizados está a borra ácida, também conhecida como “*soapstock*”. Trata-se de um subproduto proveniente do processo de refino de óleos vegetais e representa cerca de 6% do volume total de óleo bruto processado (HAAS; BLOOMER; SCOTT, 2000). No processo de refino, a borra é gerada na etapa de neutralização alcalina de AGLs (Figura 5), gerando uma emulsão oleosa constituída por água, AGLs saponificados, triacilgliceróis, fosfolipídeos e matéria insaponificável (PARK et al., 2008).

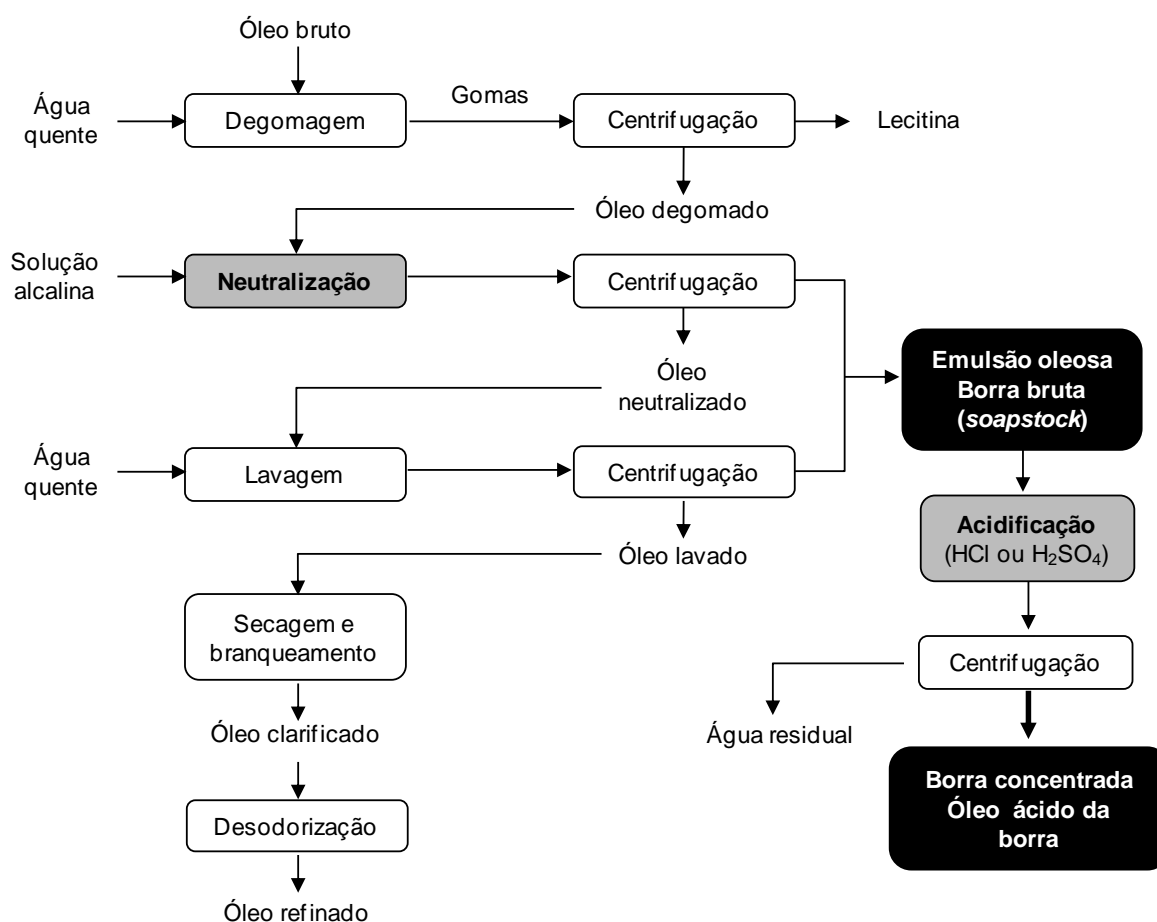


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE REFINO DE ÓLEOS VEGETAIS
 FONTE: adaptado de Moretto e Fett (1998)

A emulsão oleosa do *soapstock*, conhecida como borra bruta, contém normalmente entre 35-50% de matéria graxa saponificável (mono-, di e TAGs e AGLs). Para reduzir o custo de seu transporte, a matéria graxa pode ser recuperada da emulsão por acidificação com ácido sulfúrico ou clorídrico. Após separação da fase aquosa, a borra concentrada, conhecida como óleo ácido da borra (Figura 5), contém entre 85-95% de matéria graxa saponificável, sendo composta geralmente por 59% de AGLs, 28% de TAGs, 5% de di- e monoacilgliceróis e um percentual de substâncias não graxas (HAAS et al., 2003).

A borra bruta já foi considerada um resíduo, mas atualmente o óleo ácido da borra é uma matéria-prima alternativa como fonte de ácidos graxos de baixo custo. O valor comercial da borra bruta é um décimo do valor do óleo de soja refinado, e o valor do óleo ácido da borra concentrada é aproximadamente a metade do valor do óleo refinado (HAAS, 2005; HAAS; BLOOMER; SCOTT, 2000).

3.5.2 Tecnologias para produção de biodiesel

Os ésteres alquílicos que compõem o biodiesel podem ser sintetizados via transesterificação, utilizando TAGs e álcoois, ou via esterificação, utilizando AGLs e álcoois. A reação de transesterificação ocorre em três etapas, onde são produzidos diacilgliceróis e monoacilgliceróis como intermediários de reação, e glicerol como subproduto, enquanto que a esterificação ocorre em uma única etapa com a formação de água como subproduto (Figura 6).

Como comentado anteriormente, a produção industrial de biodiesel é feita principalmente por transesterificação alcalina, utilizando geralmente alcóxidos de metais alcalinos como catalisadores, mas carbonatos de sódio e potássio são também usados em alguns processos (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). Por este processo são obtidos rendimentos acima de 95% em até 1 h de reação utilizando razão molar de metanol:TAG de 6:1 (MATH; KUMAR; CHETTY, 2010).

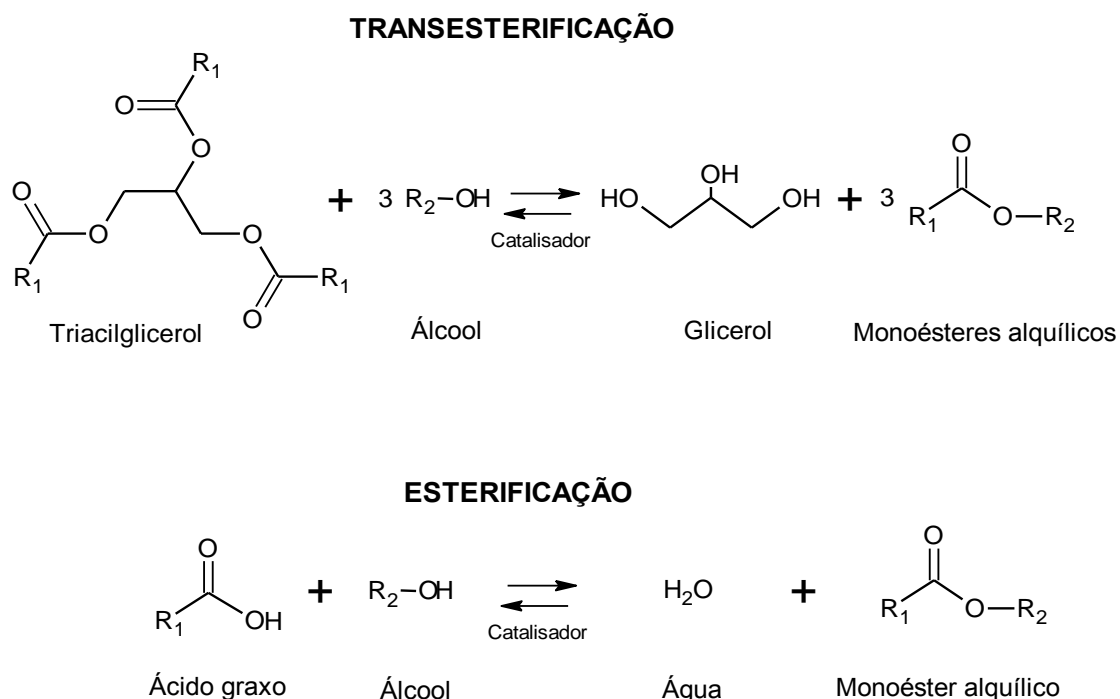


FIGURA 6 – REAÇÕES DE SÍNTESE DO BIODIESEL

A reação de transesterificação tem preferência em relação à esterificação direta de AGLs porque TAGs são mais comumente disponíveis do que AGLs (DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002). Por outro lado, o alto custo dos óleos vegetais, em comparação ao óleo diesel, e a competição pela agricultura para produção de alimentos, estimulam a busca por fontes de menor custo, como resíduos industriais (borras ácidas), óleo de cozinha usado e gordura animal. Desta forma, a busca por novas tecnologias de produção de biodiesel com diferentes matérias-primas e catalisadores é necessária, visto que o processo de transesterificação alcalina utilizado atualmente é viável apenas com matérias-primas neutras. Mais recentemente, vem sendo estudado o processo de hidroesterificação, que permite a utilização de matérias-primas de baixo custo, incluindo óleos e gorduras residuais, permitindo uma significativa redução dos custos de produção (ENCARNAÇÃO, 2008).

A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise do TAG seguida de esterificação dos AGLs (Figura 7). Este processo é uma alternativa vantajosa ao processo convencional de produção de ésteres etílicos e metílicos por transesterificação, pois favorece a utilização de matérias-primas de qualquer teor de

260°C, em ausência de catalisador. Esta reação gera rendimentos maiores do que 98% em 1 a 3 h e não necessita de catalisador (KING; HOLLIDAY; LIST, 1999; HOLLIDAY; KING; LIST, 1997; SONNTAG, 1984).

Os AGLs obtidos na hidrólise podem ser utilizados como insumos nos mercados de resinas, alimentícios, fertilizantes, plásticos, surfactantes, tensoativos, diméricos, lubrificantes, cosméticos, elastômeros, petroquímicos, biocombustíveis, entre outros (ABOISSA OLEOS VEGETAIS, 2013; DHAYMERS, 2013). As empresas brasileiras Ubaldino Rodrigues Soares (USDA) (Ponta Grossa, PR), SGSGRUPO-Oleoquímica (Ponta Grossa, PR), Irgovel (Pelotas, RS), Biobrax (Una, BA) e Indústria Campineira (Campinas, SP) são exemplos de empresas que utilizam hidrólise em água subcrítica para produção de AGLs.

AGLs obtidos na etapa de hidrólise podem ser esterificados por catálise química (ácida ou básica) e enzimática. A esterificação química é feita normalmente em meio homogêneo com catalisadores ácidos, tais como os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e sulfônico (BORGES; DIAZ, 2012). Industrialmente, o ácido sulfúrico é o mais utilizado devido ao seu baixo custo. No entanto, a recuperação do produto final e do álcool excedente é dispendiosa e requer sucessivas lavagens com água, gerando efluentes ácidos. Além disso, são necessários equipamentos mais resistentes à corrosão causada pelo ácido. Estes problemas podem ser contornados com o uso de catalisadores heterogêneos químicos ou enzimáticos.

A catálise em meio heterogêneo tem como principais vantagens a possibilidade de recuperação e reutilização do catalisador, e a geração de produtos mais puros. Vários catalisadores sólidos ácidos têm sido utilizados para esterificação de AGLs, tais como: óxidos de titânio, zircônio, nióbio, e resinas trocadoras de íons. Geralmente, são utilizadas temperaturas acima de 100°C nas reações (BORGES; DIAZ, 2012). Como alternativa para reduzir a temperatura de trabalho, o uso de enzimas imobilizadas é indicado. As enzimas imobilizadas também atuam em meio heterogêneo e produzem ésteres com elevada pureza. Além das vantagens de atuarem em meio heterogêneo, como comentado anteriormente, as enzimas podem ser produzidas e imobilizadas naturalmente em resíduos agroindustriais, que são biodegradáveis e obtidos a partir de fontes renováveis (BOTTON et al., 2013; SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007).

3.6 PRODUÇÃO DE ÉSTERES DO BIODIESEL CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS

A produção de biodiesel, em escala industrial utilizando lipases imobilizadas ainda é pequena. Apenas duas empresas na China estabeleceram a produção de biodiesel com catálise enzimática. Em 2005, a empresa Hunan Rivers Bioengineering Co. Ltd. (Hunan, China) estabeleceu a produção de biodiesel por transesterificação em tanques agitados com tecnologia desenvolvida pela Universidade de Tsinghua com a lipase Novozyme 435®. Em 2007, a empresa Lvming Environmental Protection Technology Co. Ltd. (Xangai, China) estabeleceu a produção de biodiesel por transesterificação de óleo de fritura em tanques agitados com tecnologia desenvolvida pela Universidade de Tecnologia Química de Pequim, com a lipase de *Candida* sp. 99-125 (TAN et al., 2010). A empresa Hunan Rivers Bioengineering relata como vantagens do processo enzimático o baixo custo energético e operacional, a possibilidade de reutilização da enzima, e um processo ambientalmente correto. Além disso, o glicerol gerado como subproduto é utilizado para a produção de 1,3-propanodiol, que é um composto de alto valor agregado, utilizado na síntese de monômeros para a produção de poliéteres, poliuretanos e poliésteres (HUNAN RIVERS BIOENGINEERING, 2013; TAN et al., 2010).

O processo enzimático ainda não foi adotado mundialmente na indústria de biodiesel devido principalmente ao alto custo do biocatalisador, à baixa estabilidade da enzima no meio reacional e à baixa produtividade, devido ao longo tempo de reação requerido. Como resultado destas dificuldades, muitos estudos sobre a aplicação de lipases na produção de biodiesel ainda estão sendo desenvolvidos apenas em escala laboratorial.

3.6.1 Sistemas reacionais utilizados na síntese de ésteres do biodiesel catalisada por lipases

A catálise enzimática em meios aquo-restritos ou não-convencionais pode ser realizada em diferentes tipos de sistemas reacionais, como solventes orgânicos, fluidos supercríticos, líquidos iônicos, fases gasosas ou sólidas (KRIEGER et al.,

2004; ADLERCREUTZ, 2000). Os principais sistemas utilizados como meios reacionais para produção enzimática de ésteres do biodiesel são: (1) sistemas em presença de solventes exógenos (co-solventes), que não são substratos da enzima; e (2) sistemas livres de co-solvente (SLC), onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da reação.

Geralmente, os co-solventes mais utilizados são os que possuem valores altos do parâmetro logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$), como *n*-hexano ($\log P = 3,5$) e *n*-heptano ($\log P = 4,0$). O $\log P$ é uma medida da hidrofobicidade do solvente, sendo que quanto mais alto o valor de $\log P$ mais hidrofóbico é o solvente (ZAKS; KLIBANOV, 1988). Geralmente, a adição de um co-solvente hidrofóbico em uma reação catalisada por enzima aumenta a solubilidade dos substratos e mantém a camada essencial de água que é requerida para a manutenção da sua atividade catalítica (KRIEGER et al., 2004; KRISHNA; KARANTH, 2002). Por outro lado, os co-solventes são tóxicos e inflamáveis e resultam em etapas adicionais para separação do produto (FORESTI; FERREIRA, 2005).

Para minimizar o uso de co-solventes, vem sendo estudado em biocatálise em meios orgânicos, a utilização de SLC onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da reação. A maior vantagem desse sistema é a recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação do co-solvente e a utilização dos substratos em altas concentrações, que aumenta a produtividade e consequentemente reduz o custo do processo biocatalisado (QIN et al., 2008; SELMI, et al., 1997). No entanto, em SLC várias dificuldades podem ser encontradas, como por exemplo, o aumento da viscosidade do meio reacional, e a diminuição da atividade e da estabilidade enzimática, devido à inativação da enzima pelos substratos, que nestes sistemas estão presentes em altas concentrações (HALLING, 1990). Esta inativação é causada principalmente quando são utilizados álcoois hidrofílicos de cadeia curta (metanol e etanol), que podem interagir com a camada essencial de água que envolve a enzima, alterando sua conformação ativa (ANTCZAK et al., 2009; SHIMADA et al., 2002). O mecanismo de inativação da enzima pode ocorrer também por inibição competitiva, onde moléculas do álcool se ligam reversivelmente ao sítio ativo da enzima, diminuindo o acesso do substrato hidrofóbico (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Adição do álcool em etapas tem sido utilizada como estratégia para minimizar os efeitos inibitórios do álcool na catálise enzimática (TAN et al., 2010; MADALOZZO, 2010; HAMA et al., 2007).

3.6.2 Produção de ésteres do biodiesel por transesterificação e esterificação utilizando lipases

O interesse no uso de lipases para a produção de ésteres que compõem o biodiesel surgiu nos meados da década passada, com vários estudos realizados em escala de laboratório com aplicação de lipases imobilizadas comerciais e produzidas em laboratório (Tabela 1). Nestes estudos foram obtidas conversões elevadas em éster em reações de esterificação (85 a 98%) e transesterificação (70 a 100%), catalisadas por lipases em SLC, sendo que o processo de transesterificação foi o mais utilizado. Apesar das vantagens relatadas do SLC, ainda são encontrados estudos recentes que utilizam solventes hidrofóbicos nas reações catalisadas por lipases (LIU et al., 2013; HUANG et al., 2012).

As enzimas utilizadas na síntese de ésteres foram imobilizadas em diversos tipos de suportes (resina acrílica, espuma de poliuretano, partículas magnéticas, entre outros) com diferentes graus de pureza da lipase (Tabela 1). Para a produção enzimática de biodiesel, não é requerida a utilização de enzimas puras, o que permite a utilização de enzimas de menor custo em relação àquelas purificadas. Alguns trabalhos utilizam células inteiras de micro-organismos liofilizadas ou imobilizadas em partículas de poliuretano (ADACHI et al., 2013; HUANG et al., 2012; YOSHIDA et al., 2012; QIN et al., 2008). Ressaltam-se os trabalhos de Salum et al. (2010), Zago (2010) e Fernandes et al. (2007), que utilizaram pioneiramente em reações de esterificação e transesterificação, os sólidos fermentados liofilizados de *B. cepacia* LTEB11 e *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM como catalisador sem qualquer tipo de purificação.

Na maioria das reações de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas (Tabela 1), foram utilizados como substratos AGLs de grau analítico, obtidos comercialmente, destacando-se o uso do ácido oleico, que é comumente utilizado por ser um ácido graxo presente em grande quantidade na maioria dos TAGs. Para as reações de transesterificação enzimática, o óleo de soja foi o mais utilizado, por ser um dos óleos mais utilizados para a produção industrial de biodiesel.

TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E METÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASES (continua)

| Catalisador | Reação | Suporte | Ácido/ Óleo | Álcool/ Razão Molar | Co-solvente | Conversão/ Tempo | Reator | Referência |
|---|--------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|
| <i>Rhizopus microsporus</i> | Esterificação | ¹ SF (bagaço de cana) | Ácido oleico | Etanol (10:1) | Ausência | 98%/ 48 h | Frasco (Batelada) | BOTTON et al. (2013) |
| ² <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante | Esterificação | Espuma de poliuretano | ³ AGL (óleos de palma e soja) | Metanol (1,5:1) | Ausência | 90 a 93%/ 10 h | Frasco (Batelada) | ADACHI et al. (2013) |
| <i>Rhizopus microsporus</i> | Esterificação | ¹ SF ⁴ (BC+FSG) | Ácido oleico | Etanol (3:1) | <i>n</i> -Heptano | 98%/ 3 h | Frasco (Batelada) | ZAGO (2010) |
| <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | Esterificação | ¹ SF ⁴ (BC+FSG) | Ácido oleico | Etanol (3:1) | <i>n</i> -Heptano | 95%/ 24 h | Frasco (Batelada) | SALUM (2010) |
| <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | Esterificação | Accurel EP 100 | Ácido oleico | Etanol (3:1) | <i>n</i> -Heptano | 99%/ 3 h | Frasco (Batelada) | SALUM et al. (2008) |
| <i>Candida antarctica</i> | Esterificação | Quitosana | Ácido oleico | Etanol (1:1) | Ausência | 85%/ 72 h | Frasco (Batelada) | FORESTI et al. (2008) |
| <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | Esterificação | ¹ SF (farelo de milho) | Ácido oleico | Etanol (5:1) | <i>n</i> -Heptano | 94%/ 18 h | Frasco (Batelada) | FERNANDES et al. (2007) |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> | Transesterificação | ¹ SF ⁴ (BC+FSG) | Óleo de soja | Etanol (4:1) | <i>t</i> -Butanol | 86%/ 96 h | Frasco (Batelada) | LIU et al. (2013) |
| <i>Aspergillus nomius</i> | Transesterificação | Espuma de poliuretano | Óleo de palma | Metanol (5:1) | <i>t</i> -Butanol | 95%/ 40 h | Frasco (Batelada) | TALUKDER et al. (2013) |
| ⁵ <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante | Transesterificação | Espuma de poliuretano | Óleo de palma | Metanol (4:1) | Ausência | 100%/ 96 h | Frasco (Batelada) | ADACHI et al. (2013) |
| <i>Burkholderia</i> sp. | Transesterificação | Partículas magnéticas | Óleo de oliva | Metanol (4:1) | Ausência | 70%/ 12 h | Frasco (Batelada) | LIU et al. (2012) |

¹SF: sólido fermentado; ²*Aspergillus oryzae* expressando lipases de *Candida antarctica*; ³AGL: ácidos graxos livres; ⁴(BC+FSG) mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; ⁵*Aspergillus oryzae* expressando lipases de *Geobacillus thermocatenulatus*.

TABELA 1 - ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E METÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASES (conclusão)

| Catalisador | Reação | Suporte | Ácido/ Óleo | Álcool/ Razão Molar | Co-solvente | Conversão/ Tempo | Reator | Referência |
|---|--------------------|---|----------------|---------------------------|-------------------|--|-----------------------|-------------------------|
| ⁶ <i>Rhizomucor miehei</i> recombinante | Transesterificação | Células inteiras liofilizadas | Óleo de soja | Metanol (4,5:1) | iso-Octano | 83%/ 72 h | Frasco (Batelada) | HUANG et al. (2012) |
| <i>Burkholderia sp.</i> | Transesterificação | Partículas magnéticas | Óleo de oliva | Metanol (4:1) | Ausência | 70%/ 12 h | Frasco (Batelada) | LIU et al. (2012) |
| ⁷ <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante | Transesterificação | Espuma de poliuretano | Soja e canola | Metanol (4,2:1) | Ausência | 96%/ 14 h | Leito fixo (Batelada) | YOSHIDA et al. (2012) |
| <i>Candida antarctica</i> Novozyme 435® | Transesterificação | Resina acrílica | Soja e canola | Metanol ⁸ (ni) | Ausência | 96%/ 550 h 9 mL min ⁻¹ | Leito fixo (Contínuo) | HAMA et al. (2011b) |
| <i>Candida antarctica</i> Novozyme 435® | Transesterificação | Resina acrílica | Óleo de soja | Metanol (4:1) | <i>t</i> -Butanol | 83%/ ⁸ (ni) 0,1 mL min ⁻¹ | Leito fixo (Contínuo) | CHEN et. al. (2011) |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | Transesterificação | Nanopartículas Fe ₃ O ₄ | Óleo de soja | Metanol (4:1) | Ausência | 88%/ 192 h 0,25 mL min ⁻¹ | Leito fixo (Contínuo) | WANG et al. (2011) |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Transesterificação | Sílica porosa | Óleo de soja | Etanol (3:1) | Ausência | 70%/ 10 h | Frasco (Batelada) | RODRIGUES et al. (2010) |
| <i>Rhizopus microsporus</i> | Transesterificação | ¹ SF ⁴ (BC+FSG) | Óleo de milho | Etanol (3:1) | <i>n</i> -Heptano | 57%/ 120 h | Leito fixo (Batelada) | ZAGO (2010) |
| <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | Transesterificação | ¹ SF ⁴ (BC+FSG) | Óleo de soja | Etanol (3:1) | Ausência | 95%/ 46 h | Leito fixo (Batelada) | SALUM et al. (2010) |
| <i>Rhizopus chinensis</i> | Transesterificação | Células inteiras liofilizadas | Óleo de soja | Metanol (3:1) | Ausência | 86%/ 72 h | Frasco (Batelada) | QIN et al. (2008) |

¹SF: sólido fermentado; ⁴(BC+FSG): mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; ⁶*Rhizomucor miehei* expressando lipase de *Pichia Pastoris*; ⁷*Aspergillus oryzae* expressando lipases de *Fusarium heterosporum*; ⁸(ni): os autores não informaram os dados claramente; Para as reações em regime contínuo, foram informados pelos autores o tempo total de funcionamento do reator e a vazão volumétrica utilizada.

Como relatado anteriormente, o processo de transesterificação ainda é mais estudado do que o processo de esterificação, devido à maior disponibilidade de TAGs. No entanto, a esterificação enzimática pode ser vantajosa comparada à transesterificação devido à ausência do glicerol, que é formado na transesterificação. O glicerol forma uma camada hidrofílica na superfície do suporte, deixando a lipase inacessível aos substratos hidrofóbicos (SALUM et al., 2010; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000; DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999). Além disso, o álcool não reagido migra do meio reacional para a camada hidrofílica formada, resultando em inativação da enzima pelo aumento da concentração do etanol próximo da enzima imobilizada. Outro problema relatado em reações operadas em leito fixo, é o entupimento do leito devido ao acúmulo de glicerol, que tem alta viscosidade. Para contornar estes problemas, o processo de transesterificação enzimática requer etapas adicionais de recuperação do glicerol, que além de ficar adsorvido no suporte, é contaminado com o álcool da reação (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAMA et al., 2007; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000).

3.6.3 Produção de ésteres do biodiesel por hidroesterificação utilizando lipases

Como relatado na revisão bibliográfica, o processo de hidroesterificação é uma alternativa para o processo de transesterificação alcalina, principalmente para matérias graxas com teores de AGLs acima de 1% e de água acima de 0,5%. Este processo ainda é pouco conhecido para a produção de ésteres envolvendo lipases, tendo sido encontrados poucos trabalhos na literatura com estudos de produção de ésteres por este processo (Tabela 2).

TABELA 2 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS POR HIDROESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASES

| Referência | ADACHI et al. (2013) | DE SOUSA et al. (2010) | TALUKDER; WU; CHUA (2010) | CAVALCANTI-OLIVEIRA et al. (2010) | WATANABE et al. (2007) |
|---|---|--|--|--|--|
| Hidrólise | enzimática | enzimática | enzimática | enzimática | enzimática |
| Catalisador | <i>Candida rugosa</i> (4,5% m/m _{óleo}) | <i>Jatropha curcas</i> ³ LSG (10% m/m _{óleo}) | <i>Candida rugosa</i> (0,05% m/m _{óleo}) | <i>Thermomices lanuginosus</i> (2,3% m/m _{óleo}) | <i>Candida rugosa</i> ⁴ (0,07% m/m _{óleo}) |
| Temperatura pressão (1 atm) Reator | 30 a 50°C, frasco agitado (1 L, 150 rpm) | 40°C, frasco agitado (1,5 L, 450 rpm) | 30°C, frasco agitado (80 mL, 250 rpm) | 60°C, frasco agitado (1 L) | 30°C, frasco agitado (500 rpm) |
| Reagentes | água:óleo de soja ou palma (0,5:1; m/m) | tampão Tris-HCl (0,1 mol L ⁻¹):óleo de pinhão manso (9:1; V/V) | água:OGR (1:1; V/V) | água:óleo de soja (1:1; V/V) | água: ⁵ óleo ácido (0,7:1; m/m) |
| Conversão, tempo | ¹ (ni), 24 h | 98%, 2 h | 100%, 10 h | 89%, 48 h | 92%, 24 h |
| Esterificação | enzimática | química | química | química | enzimática |
| Catalisador | ² <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante | ácido nióbico 20% (m/m _{AG}) | Amberlyst 15 100% (m/m _{AG}) | ácido nióbico 20% (m/m _{AG}) | ⁶ <i>Candida antarctica</i> 1,5% (m/m _{AG}) |
| Temperatura pressão Reator | 30°C, 1 atm, frasco agitado (150 rpm) | 200°C, 34 atm, reator agitado de alta pressão (500 rpm) | 60°C, frasco agitado (80 mL, 250 rpm) | 200°C, 24 atm, reator agitado de alta pressão (500 rpm) | 30°C, 1 atm, frasco agitado (2L, 120 rpm) |
| Reagentes | Metanol:AG (1,5:1) | Metanol:AG (3:1) | Metanol:AG (4:1) em iso-octano | Metanol:AG (3:1) | Metanol:AG (5:1) |
| Conversão, tempo | 90 a 93%, 10 h | 97%, 2 h | 99%, 2 h | 92%, 1 h | 96%, 24 h |

¹Os autores não informaram a conversão obtida; ²*Aspergillus oryzae* expressando lipase de *Candida antarctica* imobilizada em espuma de poliuretano; ³LSG: lipases de sementes germinadas; ⁴dados calculados com os dados fornecidos pelos autores; ⁵óleo ácido proveniente do processo de refino de oleaginosas (os autores não informaram o tipo de oleaginosa); ⁶lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozyme 435®); AG: ácidos graxos obtidos na etapa de hidrólise; OGR: óleo de gordura residual de fritura; a tabela foi preenchida com base nas informações descritas pelos autores, no entanto, em alguns trabalhos os dados não foram mostrados claramente.

Na maioria dos estudos foram utilizadas lipases comerciais. A lipase de *Candida rugosa* (Meito Sangyo Co. Ltd., Osaka, Japão) foi utilizada em três estudos na etapa de hidrólise, devido à sua alta atividade hidrolítica (360 U mg^{-1}) (ADACHI et al., 2013; TALUKDER; WU; CHUA, 2010; WATANABE et al., 2007). Foram obtidos com esta lipase 92% (24 h) de conversão na hidrólise de um óleo ácido (proveniente do refino de oleaginosas) e 100% (10 h) na hidrólise de um óleo de gordura residual de fritura a 30°C , em meio reacional contendo 0,06 e 0,05% da enzima liofilizada (m/m_{óleo}), respectivamente (TALUKDER; WU; CHUA, 2010; WATANABE et al., 2007). Em outro estudo, foi utilizada uma lipase de *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme, Novozyme) com atividade hidrolítica de 1.064 U mL^{-1} , obtendo-se 89% de conversão em 48 h, a 60°C , em meio reacional contendo 2,3% da preparação da lipase líquida (m/m_{óleo}) (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Em apenas um estudo foi utilizada uma lipase não comercial na etapa de hidrólise, proveniente de sementes germinadas de *Jatropha curcas* (pinhão manso) (DE SOUSA et al., 2010). Neste estudo, foram obtidos 98% de conversão em apenas 2 h na hidrólise do óleo. No entanto, foi utilizada nesta etapa uma razão de água/óleo de 9:1 (V/V), equivalente a um excesso de água de 9 a 18 vezes maior quando comparado com os outros trabalhos, que utilizaram razão de água/óleo de 0,5:1 (m/m) até 1:1 (V/V) (Tabela 2) (ADACHI et al., 2013; TALUKDER; WU; CHUA, 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010; WATANABE et al., 2007).

Na etapa de esterificação, foram obtidas elevadas conversões (92 a 97%) em um tempo curto de reação (1 a 2 h) com o catalisador químico heterogêneo ácido nióbico; no entanto, as reações foram realizadas em reatores agitados (500 rpm) com alta pressão (24 a 34 atm) e temperatura (200°C) (DE SOUSA et al., 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010). Talukder, Wu e Chua (2010) obtiveram 99% de conversão em 2 h em temperatura branda (60°C) na esterificação química catalisada por uma resina de troca iônica ácida (Amberlyst 15), mas utilizaram co-solvente (iso-octano) na reação. Os autores justificaram o uso de um catalisador químico na etapa de esterificação devido à inativação de lipases pelo metanol; no entanto, vários estudos mostram a possibilidade da adição de metanol ou etanol em etapas para minimizar o efeito inibitório (TAN et al., 2010; MADALOZZO, 2010; HAMA et al., 2007), enquanto outros adicionam o álcool em uma única etapa sem problemas de inibição (ADACHI et al., 2013; WATANABE et al., 2007). Por exemplo, Adachi et al. (2013) utilizaram na etapa de esterificação a lipase recombinante de

Aspergillus oryzae imobilizada em espuma de poliuretano em meio reacional com adição do metanol (razão molar 1,5:1) em uma única etapa e obtiveram 90 a 93% de conversão em 10 h. Watanabe et al. (2007) também adicionaram na reação de esterificação catalisada pela lipase *C. antarctica* comercial (Novozyme 435®) o metanol em uma única etapa (razão molar 5:1) e obtiveram 96% de conversão em 24 h. Todas as reações de esterificação foram feitas em regime de batelada, em frascos ou reatores com agitação (Tabela 2). De maneira geral, altas conversões (90 a 96%) foram obtidas nas reações de esterificação enzimática, mas em temperaturas menores (30°C) e com maior tempo de reação (10 a 24 h), comparadas com as reações catalisadas quimicamente.

3.6.4 Reatores com enzimas imobilizadas para síntese do biodiesel

Reações catalisadas por enzimas imobilizadas, em geral, podem ser feitas em reatores com diferentes configurações. Os reatores enzimáticos mais comuns são os de tanques agitados (CSTR), leito fixo ou leito fluidizado, que podem ser operados de forma contínua, descontínua (batelada) ou descontínua alimentada. Nos reatores de tanques agitados, as enzimas imobilizadas são misturadas ao meio reacional, e a agitação pode ser feita por agitadores orbitais ou mecânicos. A agitação promove a mistura do meio reacional evitando gradientes de temperatura e concentração. Este tipo de reator tem sido o mais utilizado em escala laboratorial, devido à simplicidade e pequena quantidade de reagentes necessários para utilização nessa escala. No entanto, a utilização deste processo em maior escala não é indicada devido à baixa produtividade, necessidade frequente de esgotamento, limpeza e abastecimento a cada reação. Além disso, a cada esgotamento, a enzima imobilizada deve ser separada do meio reacional. Estes fatores dificultam a utilização deste tipo de reator em maior escala (ILLANES; ALTAMIRANO, 2008; ZANIN; MORAES, 2004; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Reatores de leito fixo são os mais indicados para uso com biocatalisadores em meio heterogêneo em escala piloto e industrial, devido à sua maior eficiência, possibilidade de reutilização da enzima sem a necessidade de separação do meio reacional, minimização dos danos do biocatalisador devido à menor tensão de

cisalhamento, maior área superficial por unidade de volume reacional, possibilidade de remoção de substâncias que causam inibição, e consequentemente menor custo operacional. No entanto, algumas desvantagens deste sistema são relatadas, como a possibilidade de compactação do leite, a formação de caminhos preferenciais e limitações de transferência de massa e calor (ILLANES; ALTAMIRANO, 2008; LAUDANI et al., 2007; WATANABE et al., 2001).

Outro fator que deve ser considerado em biorreatores enzimáticos, independentemente da sua configuração, é a perda gradativa da atividade enzimática com o tempo de operação. Por isso, torna-se importante a verificação da capacidade de reutilização das lipases, que interfere diretamente no custo do processo. A perda da atividade enzimática pode ocorrer devido à desnaturação térmica, dessorção da enzima ou desintegração do suporte, causando modificação na estrutura da lipase cataliticamente ativa, degradação microbiana, ou envenenamento, e adsorção de compostos polares sobre o suporte da enzima. A adsorção de compostos polares pela enzima ocasiona problemas de limitação difusional e inibição enzimática pelos alcoóis de cadeia curta como o metanol e o etanol. Este fenômeno tem sido bastante relatado em reações de transesterificação com a formação de glicerol, como mencionado anteriormente (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAMA et al., 2007; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000).

O estudo de reações em leito fixo, em escala laboratorial, é importante principalmente para prever o comportamento da enzima em diferentes condições, e verificar se o suporte é adequado para uso em grande escala. De acordo com a literatura, conforme detalhado anteriormente na Tabela 1, vários autores têm utilizado reatores de leito fixo com lipases imobilizadas, em escala laboratorial, para a produção de ésteres por transesterificação. Não foram encontrados estudos de esterificação em reatores de leito fixo. Na maioria dos trabalhos foram utilizadas lipases comerciais, como a de *C. antarctica* (Novozyme 435®), *P. cepacia* e *T. lanuginosus* (TL100) (HAMA et al., 2011b; CHEN et al., 2011; WANG et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010), imobilizadas em suportes comerciais (resina acrílica e espuma de poliuretano), conforme mostrado anteriormente na Tabela 1 (YOSHIDA et al., 2012; HAMA et al., 2011b; CHEN et al., 2011).

Destacam-se novamente os trabalhos em reator de leito fixo preenchidos com sólidos fermentados produzidos a partir de resíduos agroindustriais de bagaço

de cana (SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010). Nestes estudos, foi utilizada uma coluna de vidro de 100 mm de altura e 1,7 mm de diâmetro interno preenchida com 3 g de sólido fermentado, obtendo-se 95% de conversão em 46 h, na etanólise do óleo de soja catalisada pelo sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11 (SALUM et al., 2010), e 57% de conversão em 120 h na etanólise do óleo de milho catalisada pelo sólido fermentado de *R. Microsporus* CPQBA 312-07 DRM (ZAGO, 2010), conforme condições descritas anteriormente (3.4).

Ótimos resultados foram obtidos em trabalhos recentes realizados em reatores em série, onde é possível aumentar o tempo de contato entre a enzima e o meio reacional, possibilitando uma produção contínua de ésteres (HAMA et al., 2011b; WANG et al., 2011). Por exemplo, Hama et al. (2011b) utilizaram cinco colunas em aço inox em série de 1,5 m de altura, 15,7 mm de diâmetro interno e 290 mL de volume (cada coluna), preenchidas com a lipase Novozyme 435® (os autores não informaram a quantidade). Inicialmente, um meio reacional contendo 40 g da lipase, 1000 g de óleo vegetal (soja ou canola) e 1 equivalente molar de etanol foram agitados em um tanque por 6 h, obtendo-se 30 a 35% de conversão. A fase orgânica desta reação foi separada e alimentada na primeira coluna do reator com vazão de 9 mL min⁻¹, e o etanol foi alimentado na primeira e segunda coluna a uma vazão de 0,33 mL min⁻¹ (correspondente a 1 equivalente molar do óleo) e nas colunas seguintes a 0,17 mL min⁻¹ (correspondente a 0,5 equivalente molar do óleo). O sistema foi mantido em temperatura ambiente. Na última coluna, foram obtidos 96% de conversão durante 550 h de operação. Em outro estudo, Wang et al. (2011) utilizaram três colunas de vidro em série de 20,0 cm de altura, 1,6 mm de diâmetro interno e 160 mL de volume, preenchidas com 40 g de lipases de *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) (cada coluna). Em um vaso reacional, 500 mL de um meio reacional contendo óleo de soja:água:metanol:*n*-hexano (razão volumétrica 6:3:1:0,2, respectivamente) foram mantidos sob agitação e alimentados na primeira coluna a uma vazão de 0,25 mL min⁻¹, a 40°C. Na última coluna foram obtidos 88% de conversão durante 192 h de operação.

3.7 ESTUDOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Os estudos de esterificação enzimática de AGLs com metanol ou etanol têm sido feitos em diferentes condições reacionais (temperatura, razão molar dos substratos e quantidade de catalisador), de forma a aumentar a velocidade da reação e a conversão em ésteres. A variação das condições reacionais tem sido realizada de forma empírica, por tentativa e erro, gerando uma grande variabilidade dos valores de conversão, conforme exposto anteriormente nas Tabelas 1 e 2. Além disso, resultados conflitantes envolvendo reações bastante similares acabam sendo gerados.

Estas diferenças podem estar relacionadas com as características da enzima, como a estabilidade nas condições reacionais. O aumento da temperatura em reações enzimáticas tem dois efeitos opostos na velocidade na reação: o aumento da velocidade, causado pelo aumento da energia cinética dos reagentes e a diminuição da velocidade, causada pela desnaturação da enzima (AL-ZUHAIR; LIG; JUN, 2007; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Em relação à concentração dos substratos, um aumento da razão molar álcool:ácido graxo pode ter três efeitos na reação de esterificação: (a) deslocamento do equilíbrio para a formação dos ésteres; (b) aumento da desnaturação da enzima, causada pela interação do álcool com a água de solvatação da enzima, causando modificações na sua conformação; e (c) o aumento da inibição competitiva pelo álcool, que pode interagir com o sítio ativo da enzima, impedindo a catálise (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; SHIMADA et al., 2002). Além disso, enzimas imobilizadas em um suporte sólido atuam como um catalisador heterogêneo, e interagem de diversas formas com o meio reacional, que envolvem transferência de massa externa e interna e etapas físicas ou químicas de adsorção (FOGLER, 2002).

Vale ressaltar que a adição de um catalisador, mesmo químico, não modifica a conversão de equilíbrio. O catalisador apenas diminui o tempo necessário para se atingir o equilíbrio. No entanto, Sandoval et al. (2002) verificaram um aumento da conversão de equilíbrio com o aumento da quantidade de catalisador adicionada na síntese do oleato de etila. Os autores utilizaram como catalisador lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em um suporte hidrofílico composto por partículas

macroporosas de resina, e constataram que o equilíbrio foi deslocado devido à adsorção da água no suporte da enzima. Os autores afirmaram que a utilização de suportes hidrofílicos em reações de esterificação tem um efeito positivo por diminuir o teor de água no meio reacional contribuindo para o deslocamento do equilíbrio em direção à formação dos produtos.

Alguns autores sugerem que a atividade da lipase imobilizada depende da qualidade da interface, que é um sistema complexo de diferentes componentes, tais como a lipase, o suporte, os substratos e os produtos, que interagem entre si e afetam o desempenho da enzima (PENG et al., 2013; REIS et al., 2009; MATEO et al., 2007). No entanto, a avaliação do efeito simultâneo destas interações na catálise enzimática é complexo e ainda limitado.

Sistemas reacionais de esterificação, contendo AGLs de cadeia longa e metanol ou etanol, são miscíveis em qualquer razão molar, diferente dos sistemas de transesterificação, onde os TAGs são mais hidrofóbicos do que os AGLs e menos solúveis em álcoois de cadeia curta. No entanto, ao longo da reação de esterificação, o aumento da produção de água e de éster, assim como o consumo do etanol e do ácido graxo, alteram a polaridade do meio reacional levando à formação de um sistema bifásico, composto por uma fase orgânica e outra aquosa. O número de fases depende da polaridade e quantidade dos componentes no sistema. A formação de uma segunda fase pode ser identificada experimentalmente ou prevista por modelos termodinâmicos quando a concentração global é conhecida (FORESTI et al., 2008; FORESTI et al., 2007; SANDOVAL et al., 2002).

O conhecimento da conversão de equilíbrio termodinâmico da reação de esterificação é essencial para verificar se a conversão obtida experimentalmente condiz com a conversão de equilíbrio na temperatura utilizada. Apesar de existirem vários trabalhos na literatura com dados experimentais de reações de esterificação de AGLs para obtenção de biodiesel, poucos analisam as reações do ponto de vista termodinâmico.

Na Tabela 3 são mostrados os estudos mais relevantes, que abordam as reações de esterificação do ponto de vista termodinâmico, para produção de oleato de etila. O ácido oleico é o ácido graxo mais utilizado nos estudos, devido à maior disponibilidade de dados termodinâmicos na literatura e por ser um dos ácidos graxos mais presentes na composição de oleaginosas. Bucalá et al. (2006) utilizaram nos experimentos um ácido oleico comercial contendo 80% de ácido

oleico e 20% de outros ácidos graxos, mas para a análise termodinâmica da reação, os autores utilizaram os dados do ácido oleico puro.

TABELA 3 - DADOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES

| Fonte da lipase (suporte) | Temperatura ¹ (Conversão de equilíbrio experimental) | ¹ Modelos termodinâmicos (Conversão de equilíbrio estimada) | Referência |
|---|---|--|---------------------------|
| ² <i>Candida antarctica</i> (resina acrílica) | 45°C (75%) ³ | UNIFAC monofásico (60%) UNIFAC bifásico (75%) Solução ideal (82%) Wilson modificado (82%) | VOLL et al. (2011) |
| <i>Candida antarctica</i> (quitosana) | 45°C (85%) | UNIFAC bifásico (85%) | FORESTI et al. (2008) |
| ² <i>Candida antarctica</i> (resina acrílica) | 45°C (87%) | UNIFAC bifásico (87%) | FORESTI et al. (2007) |
| ² <i>Candida antarctica</i> (resina acrílica) | 45°C (85%) 45°C (75%) ⁴ | UNIFAC monofásico (82%) UNIFAC bifásico (70%) | BUCALÁ et al. (2006) |
| ⁵ <i>Rhizomucor miehei</i> (resina aniônica) | 40°C (85%) | UNIFAC monofásico (85%) | SANDOVAL et al. (2002) |

¹As reações foram feitas com razão molar estequiométrica de etanol:ácido oleico; ²Enzima comercial Novozyme 435®; ³Os autores utilizaram os dados experimentais de Bucalá et al. (2006); ⁴Os experimentos foram feitos com uma mistura de AGLs comercial contendo 80% de ácido oleico; ⁵Enzima comercial Lipozyme®.

Para os cálculos do equilíbrio dos estudos apresentados na Tabela 3, os autores utilizaram como sistema-modelo o ácido oleico e o etanol, em razão molar estequiométrica. O equilíbrio das reações foi calculado considerando uma mistura não ideal em fase líquida (VOLL et al., 2011; FORESTI et al., 2008; FORESTI et al., 2007; BUCALÁ et al., 2006; SANDOVAL et al., 2002). A não idealidade da fase líquida foi corrigida utilizando o modelo de contribuição de grupo UNIFAC (*Universal Functional Activity Coefficient*) para os cálculos dos coeficientes de atividade dos

componentes (MAGNUNSSSEN; RASMUSSEN; FREDENSLUND, 1981). Na maioria dos estudos, o equilíbrio foi calculado considerando um sistema bifásico (VOLL et al., 2011; FORESTI et al., 2008; FORESTI et al., 2007; BUCALÁ et al., 2006). Voll et al. (2011) calcularam a conversão de equilíbrio considerando também uma solução ideal, e, para sistemas não ideais, utilizaram diferentes modelos de contribuição de grupo (UNIFAC e Wilson modificado) para os cálculos dos coeficientes de atividade.

As conversões em ésteres, obtidas experimentalmente e estimadas por diferentes autores, foram diferentes (75 – 87%), inclusive para reações onde foi utilizada a mesma temperatura (Tabela 3). Isto ocorreu devido às diferentes considerações e ajustes nos modelos matemáticos desenvolvidos em cada estudo.

Na maioria dos estudos, as conversões estimadas que mais se aproximaram das conversões obtidas experimentalmente foram calculadas por modelos termodinâmicos que consideraram a existência de um sistema bifásico no equilíbrio, composto por uma fase aquosa e outra orgânica (VOLL et al., 2011; FORESTI et al., 2008; FORESTI et al., 2007). A análise do equilíbrio da reação em sistemas bifásicos é mais difícil comparada a sistemas monofásicos, mas mostrou ser mais precisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável (NPDEAS) da UFPR. O fluxograma da estratégia do trabalho está mostrado na Figura 8.

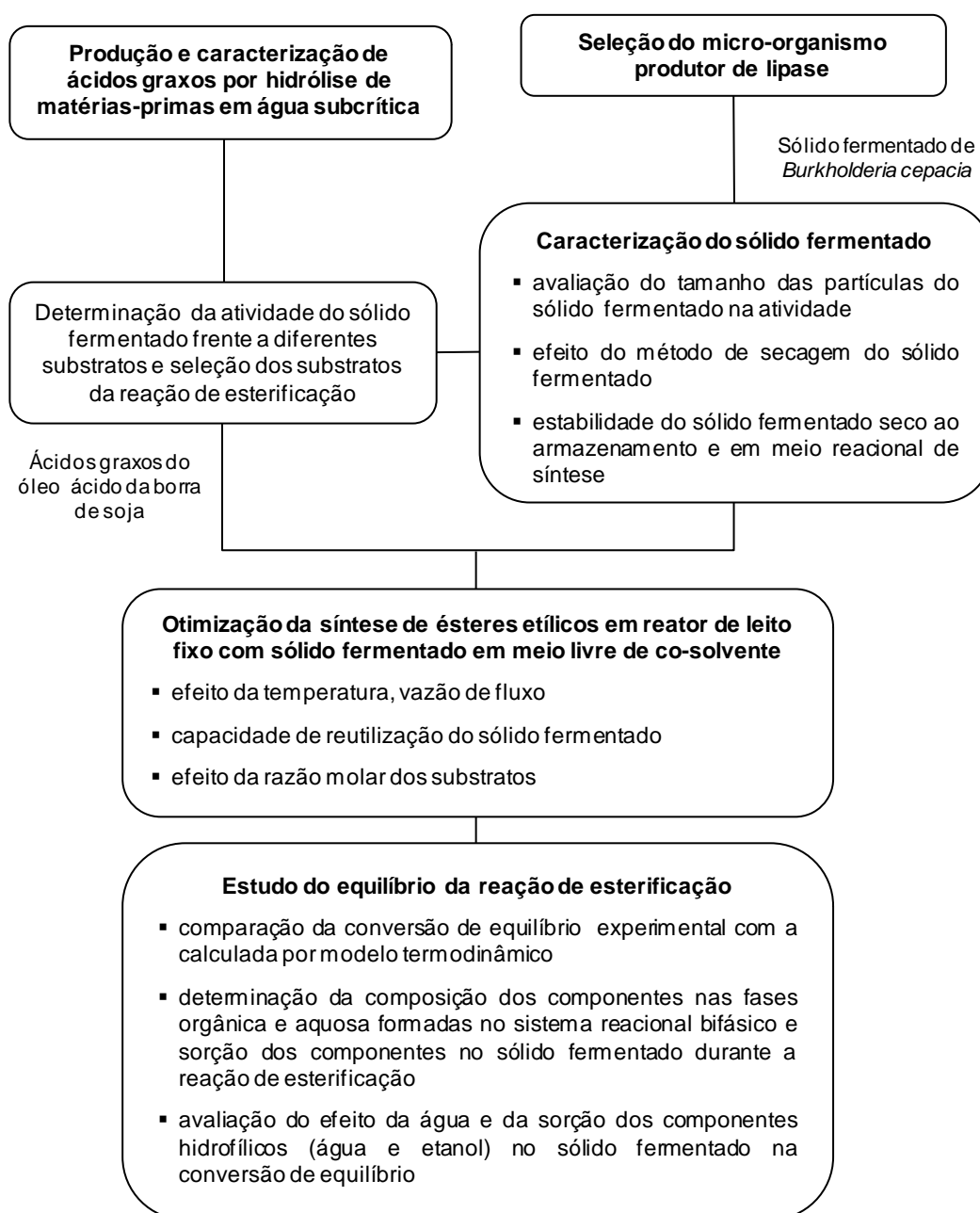


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DO TRABALHO

4.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR HIDRÓLISE DE MATÉRIAS GRAXAS EM ÁGUA SUBCRÍTICA

As reações de hidrólise foram feitas em água subcrítica, em uma planta piloto da empresa USDA, situada no Distrito Industrial de Ponta Grossa, (PR, Brasil). A planta tem tecnologia de hidrólise patenteada para processar diversas matérias-primas (óleos ácidos de borra, vegetais, residuais e gordura animal), independente da umidade e do teor de AGLs, em ausência de catalisador (PI 0604172-8 A; SOARES, 2008).

Na Figura 9 está ilustrado um fluxograma resumido do processo. O processo envolve a hidrólise contínua de matérias graxas (óleos e gorduras) em presença de água subcrítica, em uma torre de alta pressão (60 bar) e temperatura (250°C). Neste processo, a matéria graxa e a água são alimentadas na base e no topo da torre, respectivamente, reagindo em um fluxo contracorrente. Os AGLs produzidos são então descarregados a partir do topo da torre e desumidificados em um tanque de expansão por vaporização adiabática. O excesso de água mais o glicerol formado são descarregados, a partir do fundo da torre, para um concentrador de glicerina.

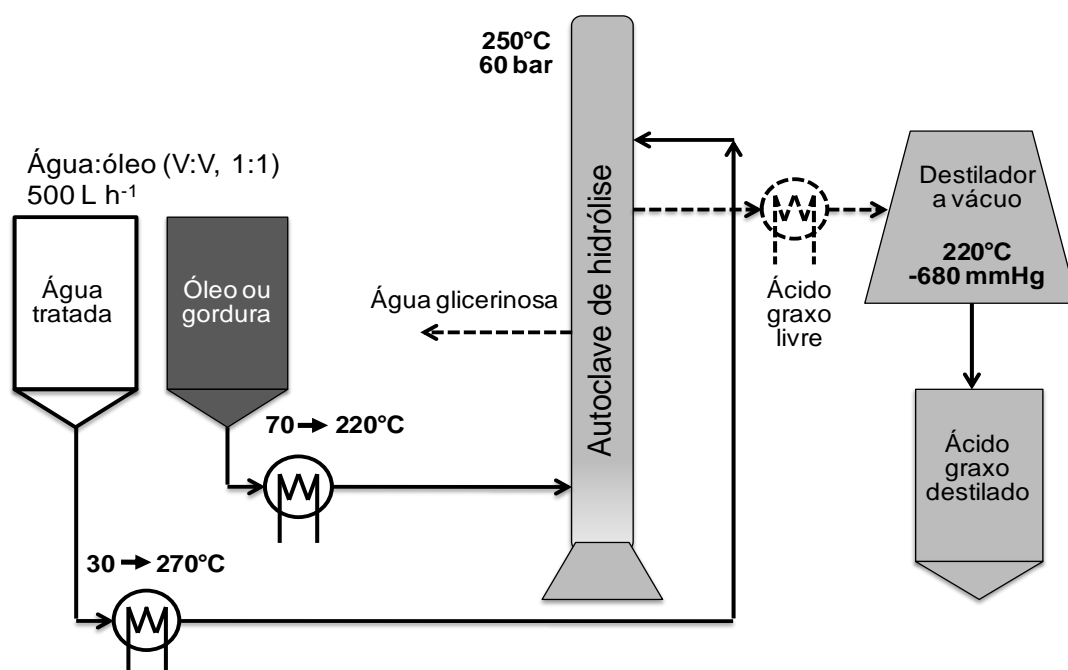


FIGURA 9 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS EM ÁGUA SUBCRÍTICA

Neste processo, o aquecimento da matéria graxa e da água é feito por um conjunto de trocadores de calor, e a energia das correntes de saída é aproveitada em trocadores de recuperação, contribuindo com a economia térmica. As reações foram feitas com vazão de entrada dos substratos de 500 L h⁻¹ e razão volumétrica de água:matéria graxa de 1:1. Após hidrólise, os AGLs foram destilados continuamente, a 220°C com pressão reduzida (-680 mmHg), para retirada de umidade e de material insaponificável (corantes, impurezas sólidas, proteínas, entre outros contaminantes).

Foram acompanhados os processos de hidrólise de diversas fontes de matérias graxas, tais como: sebo animal, óleos de soja, dendê, girassol, óleo de gordura residual (OGR), proveniente de caixas de gordura de restaurantes, e óleo ácido da borra de soja, proveniente do processo de refino. Para reduzir custos, foram utilizados neste trabalho apenas os ácidos graxos obtidos a partir de sebo animal, OGR, e óleo ácido da borra de soja, que são matérias-primas mais baratas do que as oleaginosas. Todo o processo foi acompanhado por determinação do índice de acidez (IA) das amostras (4.7.5).

4.2 PRODUÇÃO DAS LIPASES

4.2.1 Micro-organismos e manutenção

A bactéria *Burkholderia cepacia* LTEB11 utilizada neste trabalho foi isolada no LTEB e caracterizada pelo Laboratoire de Microbiologie IRD (ex-ORSTOM), Université de Provence, CESB/ESIL, Marseille, France. Mais recentemente, a cepa foi identificada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP), através de sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S como *Burkholderia lata* (espécie nova descrita recentemente por Vanlaere et al., 2009). A cepa foi então depositada no acervo da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI, UNICAMP), como *Burkholderia lata* CPQBA 515-12 DRM01. O estoque da cepa foi

preservado em Eppendorfs em meio Luria Bertani (LB) com 40% (V/V) de glicerol a -18°C.

O fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM utilizado neste trabalho foi isolado de resíduos de coco e cedido pelo Professor Jesús Córdova (Universidade de Guadalajara, México). A caracterização desta cepa foi feita pelo CPQBA (ALBERTON et al., 2010).

4.2.2 Composição e preparo dos substratos sólidos

Os substratos utilizados nas fermentações em estado sólido foram: farinha de semente de girassol, adquiridas em mercado local, e bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina de Álcool Melhoramentos (Jussara, Paraná, Brasil). A farinha de semente de girassol foi preparada através de moagem das sementes em moinho de facas, seguida de tamisação para obtenção de partículas entre 0,85 e 2,36 mm.

O bagaço de cana foi lavado três vezes com água e seco a 60°C por 24 h. Inicialmente, o bagaço foi utilizado nas fermentações sem tamisação, conforme procedimentos descritos por Zago (2010) e Salum (2010). Antes de cada experimento, as umidades dos substratos isolados e misturados foram determinadas em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.7.1.

A composição centesimal dos substratos (Tabela 4) foi determinada pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA, UFPR). A umidade, o resíduo mineral fixo e os lipídeos foram determinados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os teores de proteínas e fibras foram determinados segundo os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2005). Os carboidratos foram determinados de acordo com a Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

Os substratos sólidos utilizados nas fermentações foram compostos de uma mistura de farinha de semente de girassol e bagaço de cana, na proporção 1:1 (m/m, em base seca). A razão para a utilização desta mistura de sólidos foi o fato de ter sido empregada anteriormente com sucesso para a produção de lipases com os micro-organismos *B. cepacia* (SALUM et al., 2010) e *R. microsporus* (ZAGO, 2010).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

| Composição (%) Método utilizado | Farinha de semente de girassol | Bagaço de cana-de-açúcar |
|---|---|-------------------------------------|
| Proteínas AOAC (2005) | 18,0 | 0,88 |
| Fibras AOAC (2005) | 28,5 | 88,2 |
| Carboidratos RDC n° 360 | 45,7 | 0,1 |
| Lipídeos Instituto Adolfo Lutz (2005) | 25,9 | 0,49 |
| Umidade Instituto Adolfo Lutz (2005) | - | 9,01 |
| Resíduo mineral fixo Instituto Adolfo Lutz (2005) | - | 2,04 |

4.2.3 Fermentação em estado sólido de *Rhizopus microsporus*

O fungo foi inicialmente inoculado em tubos inclinados contendo meio BDA (batata, dextrose ágar) estéril, que foram incubados em estufa a 30°C durante 7 dias, até formação dos esporos. Para obtenção do inóculo, após o período de incubação, os esporos foram removidos, suspensos em água destilada estéril contendo Tween 80 (0,01%, V/V) e submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Improved Chamber).

Para a fermentação em estado sólido, foram adicionados 10 g da mistura de sólidos (4.2.2) com 80% de umidade (m/m), que foi previamente ajustada com adição de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0). Em seguida, os frascos foram autoclavados a 121°C por 20 min e ambientados a 40°C. Após ambientação, os frascos foram inoculados com a suspensão de esporos, de modo a obter uma concentração final no meio sólido entre 10⁷ e 10⁸ esporos gSS⁻¹. Os frascos inoculados foram incubados em estufa durante 18 h a 40°C (ALBERTON et al., 2010). Após fermentação, o sólido foi congelado e seco em um liofilizador (Jouan LP3, Virgínia, EUA) por 24 h a -45°C e 0,1 mbar. O sólido liofilizado foi moído e

tamizado para obtenção de partículas entre 0,85 mm e 2,38 mm. Após classificação, o sólido foi armazenado em sacos plásticos e mantido em refrigerador a 4°C para posterior utilização nas reações de esterificação.

4.2.4 Fermentação em estado sólido de *Burkholderia cepacia*

Para o preparo do inóculo, 1 mL da solução estoque foi vertido em uma placa contendo meio sólido LA estéril (meio LB com 1,5% de ágar bacteriológico). A placa foi incubada em estufa por 48 h a 29°C. Após este período, um quadrado de 3 mm do ágar contendo a bactéria crescida foi recortado e transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio LB. Em seguida, o frasco foi incubado a 29°C e 200 rpm em agitador orbital até o meio atingir absorvância entre 0,8 e 1,0 no comprimento de onda de 600 nm, que corresponde ao final da fase exponencial de crescimento da bactéria (FERNANDES, 2007).

Para a fermentação em estado sólido, foram adicionados 10 g da mistura de sólidos (4.2.2) com 75% de umidade (m/m), que foi previamente ajustada com adição de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Em seguida, os frascos foram autoclavados a 121°C por 20 min e ambientados a 29°C. Após ambientação, os frascos foram inoculados com 1 mL do inóculo preparado e incubados em estufa bacteriológica a 29°C por 96 h. Após fermentação, o sólido foi congelado e seco em um liofilizador (Jouan LP3, Virgínia, EUA) por 24 h a -45°C e 0,1 mbar. O sólido liofilizado foi moído e tamizado para obtenção de partículas entre 0,85 mm e 2,0 mm. Esta granulometria e o tempo de fermentação de 96 h foram utilizados apenas na primeira etapa da seleção do sólido fermentado, baseado nos estudos de Salum et al. (2010).

4.2.5 Delipidação do sólido fermentado

A delipidação do sólido fermentado foi realizada para remover os lipídeos residuais derivados da farinha de semente de girassol usada como substrato da

FES, de acordo com o proposto por Salum (2010). Para isto, o sólido fermentado foi lavado três vezes com *n*-hexano (10 mL por grama de sólido). Em cada lavagem, a mistura foi incubada em agitador orbital por 10 min a 200 rpm e 25°C. Em seguida, o solvente foi retirado por filtração e o sólido retido foi seco em dessecador a vácuo em temperatura ambiente. Para verificar a eficácia da delipidação, foram feitas análises por cromatografia de camada delgada (CCD) (4.7.9) do sobrenadante. A delipidação não foi necessária para as reações em SLC, porque o teor lipídico no sólido fermentado foi negligenciável comparado ao teor lipídico da mistura reacional.

4.2.6 Comparação entre os sólidos fermentados de *Burkholderia cepacia* e *Rhizopus microsporus*

Foram feitas reações de esterificação em presença de *n*-hexano, utilizando como substratos ácido oleico e etanol, catalisadas pelos sólidos fermentados de *B. cepacia* (SFBC) e *R. microsporus* (SFRM).

As reações foram feitas nas mesmas condições com os dois sólidos, em frascos de vidro de 12 mL com tampa de teflon, contendo 500 mg de sólido fermentado (base seca), que corresponde a 555 mg de sólido fermentado seco, contendo 10% de umidade (base seca). Cada frasco foi preenchido com 10 mL de meio reacional, e a reação foi feita em um agitador orbital a 200 rpm e 40°C. Foram testados três meios reacionais com diferentes concentrações dos substratos. A primeira reação foi iniciada com a adição dos substratos, ácido oleico (70 mmol L⁻¹) e etanol (210 mmol L⁻¹) na presença do co-solvente *n*-hexano (96%, V/V). Com o objetivo de reduzir a concentração do co-solvente, a concentração dos substratos foi aumentada para 990 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 2970 mmol L⁻¹ de etanol, na presença de *n*-hexano (51%, V/V), até eliminação completa do co-solvente, mantendo-se o volume do meio reacional constante (10 mL) e aumentando-se a quantidade dos substratos para 20,4 mmol de ácido oleico e 61,2 mmol de etanol. Para verificar se a catálise da reação de síntese do oleato de etila estava ocorrendo somente na presença da lipase ativa, foi feito um controle negativo, utilizando na reação o sólido fermentado autoclavado.

As conversões em éster foram calculadas a partir do consumo de AGLs, determinados pelo método colorimétrico de Lowry-Tinsley (4.7.4). As reações foram comparadas em termos de conversão em éster e produtividade. As produtividades em éster (P_E) foram calculadas com a Equação 1.

$$P_E = \frac{X \times N_{AGL} \times MM_{éster}}{M_{SF} \times t} \quad \text{Equação 1}$$

onde: P_E é a produtividade em éster expressa em mg de éster produzido por grama de sólido (base seca) por hora de reação ($mg_E \text{ gSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$); X é a conversão em percentual (por exemplo: para 90% de conversão, foi substituído na fórmula o valor de 0,9); M_{SF} é a massa de sólido fermentado (base seca) (gSS) utilizada na reação; t é o tempo (h) de reação no ponto avaliado; N_{AGL} é o número de mols inicial de ácidos graxos livres em mmol, e MM_E é a massa molar dos ésteres produzidos. Por exemplo, para o oleato de etila foi utilizado o valor de 310 g mol^{-1} e para os etil-ésteres da mistura de AGLs do óleo ácido da borra de soja foi utilizado o valor de 305 g mol^{-1} , que foi calculado a partir da massa molar média dos AGLs que compõem a amostra.

4.3 ESTUDOS COM O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia*

4.3.1 Efeito do tamanho das partículas do biocatalisador na atividade do sólido fermentado

Zago (2010) verificou que o tamanho das partículas do substrato sólido utilizado na fermentação de *R. microsporus* influenciou na atividade de hidrólise do sólido fermentado produzido. Por isso, neste trabalho, o efeito do tamanho das partículas foi avaliado somente para o sólido fermentado de *B. cepacia*. Para este estudo, foram comparadas as atividades de esterificação de SFBC preparado nas seguintes condições: (a) fermentação com bagaço de cana não tamizado; (b)

fermentação com bagaço de cana tamisado antes da fermentação (0,85 a 2,36 mm); (c) sólido fermentado tamisado após a fermentação (0,85 a 2,36 mm); (d) fração do sólido fermentado maior do que 2,36 mm, moída e tamisada (0,85 a 2,36 mm). Em todas as fermentações foram utilizadas partículas entre 0,85 mm a 2,36 mm de farinha de semente de girassol, na proporção 1:1 (m/m) com bagaço de cana.

Após escolha da granulometria do sólido para a fermentação, foi realizada uma cinética do cultivo, avaliando-se as atividades de hidrólise (4.7.2) e de esterificação (4.7.3), a cada 24 h. Os cultivos foram mantidos por 120 h, tendo por objetivo principal selecionar o tempo de cultivo com maior atividade da lipase.

4.3.2 Efeito da secagem do sólido fermentado

Inicialmente o sólido fermentado foi congelado em balões de fundo redondo e seco a -45°C e 0,1 mbar, por 24 h em um liofilizador (Jouan LP3, Virgínia, EUA). Este processo de secagem é habitualmente utilizado em escala de laboratório. No entanto, para a secagem de maiores quantidades de sólido fermentado, a secagem por liofilização torna-se dispendiosa. Então, foram testados dois métodos alternativos: secagem em coluna com fluxo de ar desumidificado e secagem em estufa. Em todos os métodos de secagem testados foi utilizado um SFBC com 72% de umidade inicial, que foi seco até 10% de umidade (m/m, base seca). Este sólido com 10% de umidade final foi denominado sólido fermentado seco.

Para a secagem em coluna, foi montado um sistema fechado com dois tubos de cloreto de polivinila (PVC) transparentes conectados (Figura 10). Foram utilizados tubos com 4,3 cm de diâmetro, 50 cm de altura e volume de 726 mL. O tubo inferior foi preenchido com sílica ativada para desumidificação do ar e o superior foi preenchido com 200 g de sólido fermentado úmido. Ar proveniente de um compressor foi introduzido na base da coluna inferior em sentido ascendente com fluxo de 20 L min^{-1} em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). O ar seco foi então diretamente introduzido na base da coluna com o sólido fermentado úmido. No topo da coluna superior, foi conectada uma mangueira para a saída do ar, que foi borbulhado em um Erlenmeyer contendo solução de hipoclorito 10% (m/V). Durante a secagem, a umidade da sílica foi acompanhada visualmente pela

mudança da coloração do indicador da sílica. Então, após saturação do leito de sílica com a umidade do ar, foi feita a substituição por sílica ativada. A eficiência da secagem foi avaliada por medidas da umidade do sólido fermentado, com intervalos de 1 h, em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.7.1.

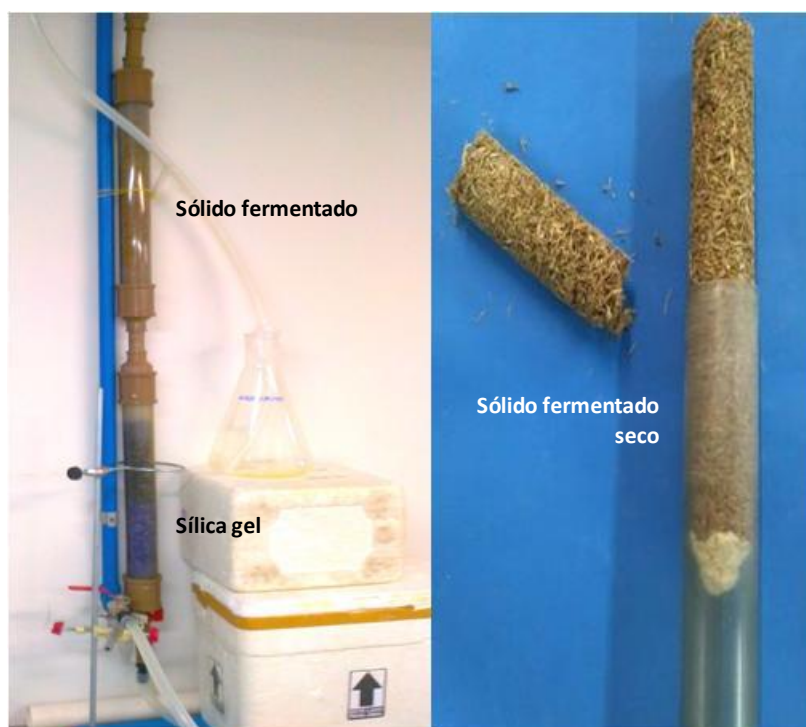


FIGURA 10 - SECADOR EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO UTILIZADO PARA SECAGEM DE SÓLIDO FERMENTADO

Condições: fluxo de ar de 20 L min^{-1} em temperatura ambiente, coluna com capacidade para secar 200 g de sólido fermentado úmido.

Para a secagem em estufa, foram distribuídos 200 g de sólido fermentado úmido em uma bandeja, que foi mantida em estufa (Nova Ética 400-3ND, São Paulo, Brasil) com ventilação a 30°C . As umidades foram determinadas antes e após secagem em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.7.1. O efeito do método de secagem foi avaliado pela medida da atividade de hidrólise contra trioleína (4.7.2) do sólido fermentado seco, tendo como controle a atividade de hidrólise do sólido fermentado úmido (antes da secagem).

4.3.3 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento

A estabilidade da atividade de SFBC foi avaliada durante o armazenamento por 12 meses, sob refrigeração a 4°C e em temperatura ambiente. Nos dois casos, o sólido fermentado seco foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram armazenados em potes plásticos, para evitar contato com ar e umidade. Amostras do sólido foram coletadas, em intervalos de tempo definidos, para determinação da atividade residual de hidrólise (4.7.2), que foi expressa em percentual da atividade de hidrólise do sólido fermentado seco, determinada no primeiro dia do armazenamento.

4.3.4 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco em meio reacional de síntese

A estabilidade da atividade de SFBC seco foi avaliada por medida da atividade de hidrólise antes e após incubação nos meios reacionais de síntese e em solventes isolados. Para isto, amostras de 500 mg de sólido foram incubadas por 48 h a 40°C, em um agitador orbital a 200 rpm, em frascos de vidro de 12 mL contendo 10 mL dos seguintes meios: (a) etanol, (b) *n*-hexano, (c) 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano e (d) mistura de etanol:ácido oleico (razão molar 3:1, SLC). Após incubação, as amostras de SFBC foram lavadas 4 vezes com 10 mL de *n*-hexano em cada lavagem para a retirada dos substratos e produtos formados durante a reação. Em seguida, todas as amostras foram filtradas e secas em dessecador a vácuo, em temperatura ambiente.

Para verificar a eficácia da lavagem, foram feitas análises por cromatografia de camada delgada (CCD) (4.7.9) do sobrenadante. A atividade residual de hidrólise foi expressa em percentual da atividade de hidrólise inicial do sólido fermentado, utilizando como substrato a trioleína (4.7.2).

4.3.5 Produção do sólido fermentado em diferentes tamanhos de frascos

Durante o desenvolvimento do projeto surgiu a necessidade de aumentar a produção do sólido fermentado. Para isto, a quantidade de substrato em base seca foi aumentada 2 vezes (20 g – frascos de 500 mL) e 8 vezes (80 g – frascos de 2000 mL), em relação à massa de 10 g (frascos de 250 mL) utilizada habitualmente. As condições utilizadas nas fermentações foram iguais em todos os frascos e as proporções inóculo:substrato foram mantidas constantes em 10% (volume de inóculo/g de substrato seco).

4.4 SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia*

4.4.1 Efeito da quantidade de sólido fermentado na reação de esterificação

O efeito da quantidade de SFBC adicionada no meio reacional foi estudado em SLC, contendo 18,9 mmol (5,34 g) de ácido oleico e 56,7 mmol (2,61 g) de etanol em diferentes quantidades de sólido fermentado (base seca): 480, 640, 800 mg, correspondentes à proporção de 9, 12 e 15% da massa de ácido oleico adicionada, respectivamente. As reações foram feitas em frascos de vidro de 12 mL com tampa de teflon, em agitador orbital a 200 rpm e 40°C.

4.4.2 Atividade do sólido fermentado frente a diferentes substratos em reações de hidrólise e de esterificação

A atividade de hidrólise de SFBC foi avaliada frente a diferentes TAGs utilizando-se o método titulométrico (4.7.2), e a atividade de esterificação frente a diferentes AGLs foi determinada pelo método de Lowry-Tinsley (4.7.3). Como fontes de TAGs foram utilizadas: trioleína (65%); tricaprilina (98%) e tributirina (98%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); gordura de sebo animal; óleos de oliva (Gallo);

girassol (Liza); canola (Liza) e soja (Liza), adquiridos em mercado local. Como fontes de ácidos graxos foram utilizadas misturas de AGLs provenientes da hidrólise em água subcrítica do sebo animal, do óleo ácido da borra de soja e OGR produzidos na empresa USDA (Ponta Grossa, PR, Brasil). Além das misturas de AGLs, foram testados AGLs de grau analítico com diferentes tamanhos de cadeia, tais como os ácidos: oleico (90%), palmítico (99%), mirístico (99%) e caprílico (99%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e linoleico (90%) esteárico (99%) e láurico (98%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

4.5 ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO

As reações de esterificação em leito fixo foram feitas em um biorreator de bancada, conforme esquematizado na Figura 11. O sistema foi composto por um reservatório de meio reacional (4,4 cm de diâmetro interno e 9,0 cm de altura) e uma coluna de vidro encamisada (2,7 cm de diâmetro interno e 21 cm de altura), com recirculação de água para manter a temperatura do meio reacional.

A coluna foi preenchida com 12 g de SFBC (base seca), que foi colocado na coluna através de um funil e então levemente prensado com o auxílio de um bastão de vidro. Nas extremidades da coluna foram colocados filtros em tecido de algodão no mesmo diâmetro da coluna para evitar arraste do sólido fermentado. A coluna foi então fechada com rolhas de silicone, e após fechamento, a altura do leito de SFBC foi de 16 cm, que correspondeu a uma densidade de leito de 130 g L^{-1} . O reservatório foi abastecido com 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja (equivalentes a 361 mmol, considerando massa molar de 277 g), e 50 g de etanol (equivalentes a 1085 mmol). Para os ensaios, a razão molar 3:1 (etanol:ácido graxo) foi mantida constante, e a mistura reacional (ácido graxo e etanol) foi mantida no reservatório sem agitação, formando no início da reação um sistema monofásico. Essa mistura foi continuamente recirculada em um fluxo ascendente através da coluna, utilizando-se uma bomba peristáltica, modelo 45MHP10 (Metex Corporation, Buffalo, Nova York, EUA). Foram testados inicialmente, os efeitos da vazão de

recirculação através da coluna (2, 5 e 10 mL min⁻¹) e da temperatura (40, 50 e 60°C) na conversão em éster.

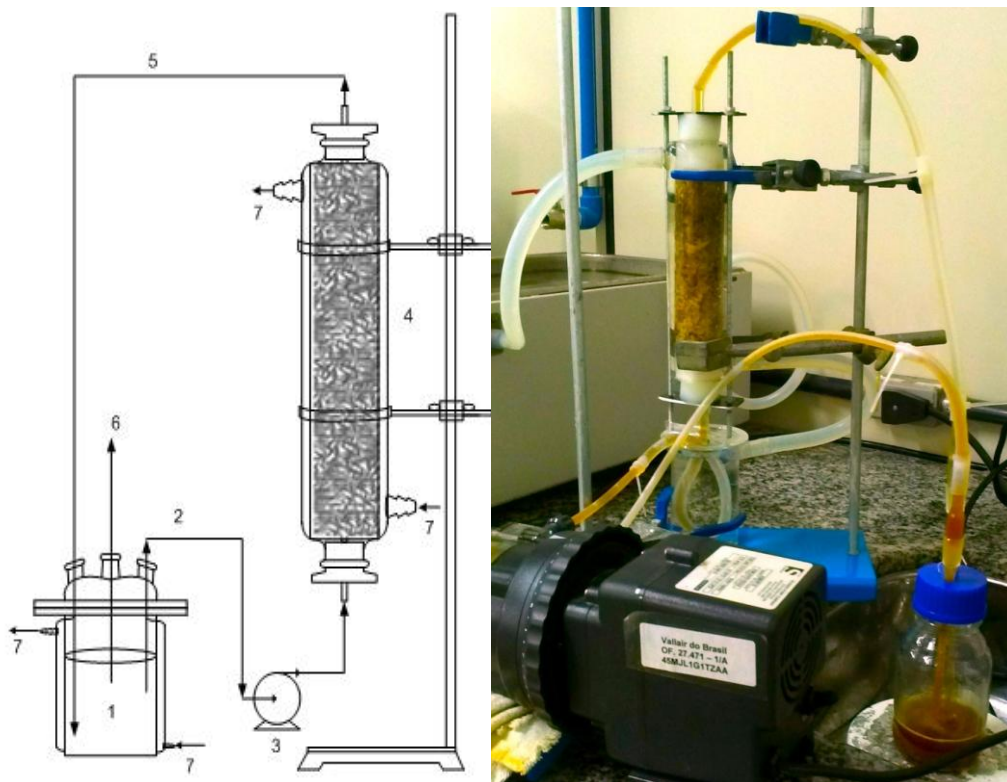


FIGURA 11 - REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL

(1) reservatório contendo meio reacional; (2, 5) meio reacional em recirculação; (3) bomba peristáltica; (4) coluna de vidro preenchida com sólido fermentado; (6) amostragem; (7) circulação de água termostatzada.

Durante a reação, alíquotas de 500 mg de amostra foram coletadas e lavadas três vezes com 1 mL de solução saturada de NaCl (para retirada do excesso de etanol). Após lavagem, a fração orgânica (contendo os ésteres) foi transferida para um Eppendorf contendo 50 mg de sulfato de sódio anidro. O Eppendorf foi agitado em vórtex por 20 s e mantido em repouso por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 5000×g por 5 min e a amostra lavada e seca foi transferida para outro Eppendorf limpo. As conversões em éster foram calculadas a partir dos valores do índice de acidez das amostras lavadas e secas, conforme descrito em 4.7.5.1. O teor de éster da alíquota final foi avaliado também por cromatografia gasosa, conforme descrito em 4.7.10.2.

4.5.1 Estudo de reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação

O estudo de reutilização de SFBC foi feito com as mesmas quantidades de SFBC e mistura reacional utilizada nos estudos preliminares no reator de leito fixo. As reações foram feitas com vazão de recirculação de 5 mL min^{-1} , nas temperaturas de 45 e 50°C. Para cada temperatura utilizada, SFBC foi reutilizado por oito ciclos de 48 h cada. Após cada ciclo, a mistura reacional contida no leito fixo foi bombeada em fluxo descendente (5 mL min^{-1}), com o auxílio da bomba peristáltica, para o reservatório por 20 min. Em seguida, a mistura reacional foi coletada e substituída por uma nova mistura. As conversões foram analisadas após cada ciclo de reutilização e expressas em percentual da conversão obtida no primeiro ciclo.

4.5.2 Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação

Inicialmente, foram feitas reações de esterificação em frascos agitados para definir a faixa de trabalho para o estudo do efeito da razão molar dos substratos (etanol:ácido graxo) em reator de leito fixo. Para isto, frascos de vidro de 12 mL com tampa de teflon foram preenchidos com 610 mg de SFBC (base seca), e 5085 mg de AGLs do óleo ácido da borra de soja, nas razões molares 1:1, 3:1 e 5:1, que correspondem à adição de 845, 2534 e 4223 mg de etanol, respectivamente. As reações foram mantidas em um agitador orbital a 200 rpm e 45°C.

Para verificar um possível efeito inibitório da lipase pelo etanol, SFBC que foi utilizado na reação com razão molar 5:1 foi reutilizado em uma nova reação com razão molar 1:1. Para isto, o sólido utilizado na reação com razão molar 5:1, foi recuperado, lavado e seco, conforme procedimento descrito em 4.2.5. Em seguida, o sólido foi reutilizado em uma nova reação com razão molar 1:1. As conversões em éster foram calculadas a partir dos valores do índice de acidez das amostras lavadas e secas, conforme metodologia descrita em 4.7.5.1.

4.6 ESTUDO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO E DE FASES

Para este estudo, o leito fixo foi preenchido com 12 g de SFBC (base seca), equivalentes a 13,3 g de SFBC com 10% de umidade (m/m). O reservatório foi abastecido com 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja (equivalentes a 361 mmol, considerando massa molar de 277 g), nas razões molares (etanol:ácido graxo) 1:1, 1,5:1 e 3:1, que correspondem à adição de 25, 50 e 100 g de etanol, respectivamente. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética (200 rpm) no reservatório, a 45°C e continuamente recirculado em sentido ascendente através da coluna com uma bomba peristáltica com vazão ajustada para 5 mL min⁻¹. Esta faixa de trabalho de razão molar foi definida conforme avaliação dos resultados obtidos no estudo preliminar feito em frascos agitados (item 4.5.2).

Para tempos de reação definidos (entre 0 e 48h) foram determinados os componentes da mistura reacional global e de cada fase (aquosa e orgânica), bem como a *sorção da mistura reacional em SFBC (Figura 12). Para estas análises foi necessária uma nova reação com SFBC e meio reacional novo para cada tempo estudado. Após cada intervalo de tempo, o meio reacional foi drenado do reator de leito fixo para o reservatório, por 20 min em fluxo descendente (5 mL min⁻¹) com o auxílio da bomba peristáltica. Em seguida, SFBC foi retirado da coluna, e a quantidade total de meio reacional sorvido por SFBC foi determinada por diferença de peso em relação à quantidade de SFBC adicionada no início da reação. Além disso, foi determinado o teor de água e etanol sorvidos por SFBC em balança de infravermelho (4.7.1).

Os componentes (AGLs, etanol, água e etil-ésteres) da mistura reacional global e de cada fase (aquosa e orgânica) foram determinados conforme procedimento descrito em 4.6.1. A separação das fases foi feita por centrifugação de 50 g do meio reacional global por 10 min a 5000×g, conforme esquema descrito na Figura 12. A composição da fase aquosa foi determinada somente para os tempos de reação onde foi formada quantidade suficiente desta fase (500 µL) para determinação de todos os componentes.

*Sorção é um termo geral que inclui os fenômenos de adsorção e absorção (PERRY; CHILTON, 1973). O sólido fermentado utilizado neste trabalho é um material sorvente com capacidade de absorver o meio reacional, por acúmulo dos componentes por interpenetração no sólido, e adsorver, por acúmulo dos componentes na superfície ou interface.

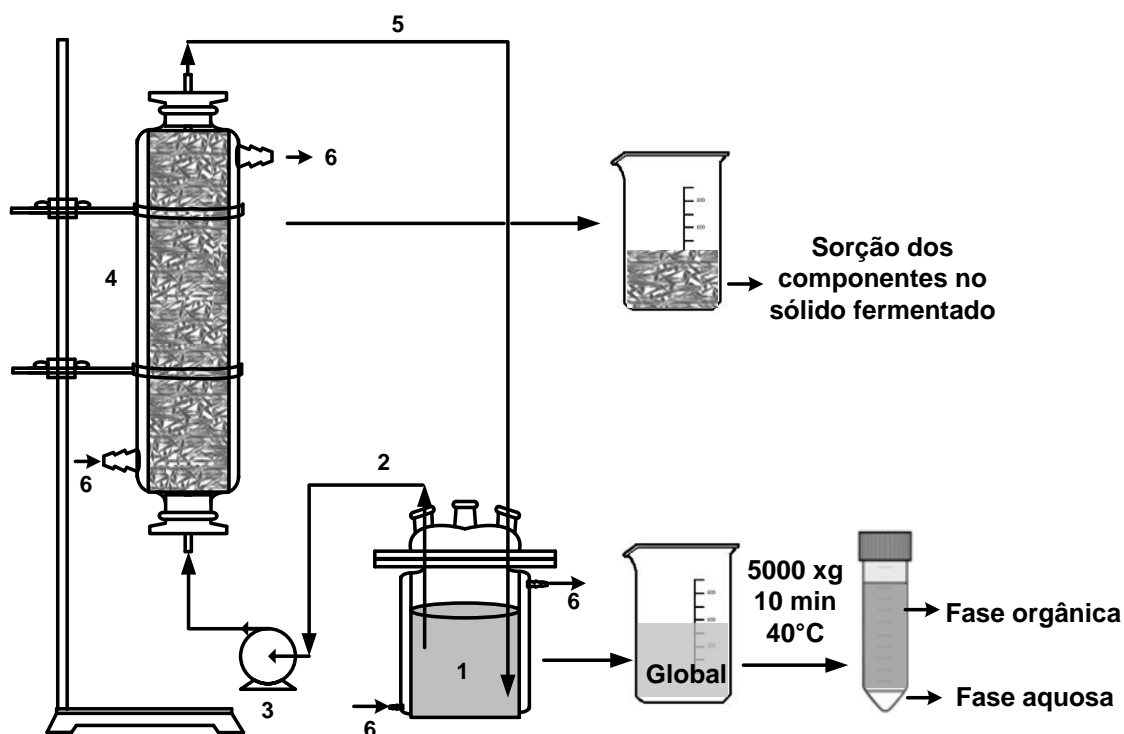


FIGURA 12 - ESQUEMA EXPERIMENTAL DO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DAS FASES DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

(1) reservatório contendo meio reacional sob agitação magnética de 200 rpm; (2, 5) meio reacional em recirculação com vazão de 5 mL min⁻¹; (3) bomba peristáltica; (4) coluna de vidro preenchida com 12 g de sólido fermentado (base seca); (6) circulação de água termostatzada.

4.6.1 Determinação dos componentes na mistura reacional global e nas fases orgânica e aquosa

Os teores de AGLs e de água foram determinados conforme métodos descritos em 4.7.5 e 4.7.8, respectivamente. O teor de etanol foi determinado por cromatografia gasosa, conforme método descrito em 4.7.10.3. Após determinação dos teores de AGLs, água e etanol, o teor de etil-ésteres foi determinado por diferença entre 100% da amostra total e a soma dos componentes já determinados. A determinação do teor de etil-ésteres por diferença, foi adotada após verificação do teor de etil-ésteres por cromatografia gasosa, conforme método descrito em 4.7.10.2. Foram observadas diferenças menores do que 1% nos resultados obtidos pelos dois métodos. Assim, foi adotado o método por diferença por praticidade e redução do número de análises.

4.6.2 Influência da agitação e do teor de água na conversão de equilíbrio de reações de esterificação em reator de leito fixo

Para avaliar a influência da agitação da mistura reacional contida no reservatório e do teor de água na conversão de equilíbrio, foram feitas reações em diferentes condições, conforme descrito na Tabela 5. Todas as reações foram feitas com uma mistura reacional contendo 25 g de etanol e 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, correspondente à razão molar (etanol:ácido graxo) 1,5:1. Foram utilizados sólidos com umidade inicial de 10 e 5%, que correspondem à adição de 13,3 g e 12,6 g de SFBC ao meio reacional, respectivamente. Desta forma, a quantidade de SFBC em base seca (12 g) foi mantida.

A influência do teor de água inicial da mistura reacional foi avaliada através da adição de diferentes percentuais de água (10 e 20%, em relação à massa da mistura reacional) no início da reação. O teor de 0,5% (m/m) equivale à umidade natural da mistura reacional (Tabela 5). Além do efeito da adição de água, foi verificado também o efeito da retirada de água através da adição de peneira molecular de 3Å (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

TABELA 5 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ÁGUA NA CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO

| Experimento | Umidade inicial do sólido fermentado (m/m) | Agitação da mistura reacional no reservatório | Teor de água inicial na mistura reacional (m/m) | *Adição de peneira molecular |
|-------------|--|---|---|------------------------------|
| 1 | 10% | 200 rpm | 0,5% | - |
| 2 | 10% | - | 0,5% | - |
| 3 | 10% | - | 10% | - |
| 4 | 10% | - | 20% | - |
| 5 | 5% | - | 0,5% | - |
| 6 | 10% | - | 0,5% | 35 g |

*A peneira molecular foi adicionada no reservatório da mistura reacional, após 6 h do início da reação.

Durante a reação, foi analisada somente a conversão em éster por índice de acidez, conforme método descrito em 4.7.5.1. Então, quando foi atingida a conversão de equilíbrio, foram determinados também os componentes na mistura reacional, bem como o teor de água e etanol sorvidos por SFBC em balança de infravermelho (4.7.1).

4.6.3 Cálculo do equilíbrio termodinâmico

Com o objetivo de analisar a conversão de equilíbrio experimental, cálculos termodinâmicos foram realizados para a determinação da conversão de equilíbrio nas condições utilizadas neste estudo. Os cálculos termodinâmicos foram gentilmente realizados pelo Prof. Marcos Lúcio Corazza do Departamento de Engenharia Química da UFPR, utilizando uma abordagem descrita em trabalhos recentes do seu grupo de pesquisa (PAIVA et al., 2013; GRAESER, 2013). O detalhamento dos cálculos utilizados está descrito no Anexo A.

Resumidamente, o equilíbrio da reação foi calculado considerando uma mistura não ideal em fase líquida. A não idealidade da fase líquida foi corrigida utilizando o modelo de contribuição de grupo UNIFAC – LL para os cálculos dos coeficientes de atividade (MAGNUNSEN; RASMUSSEN; FREDENSLUND, 1981). Durante os cálculos do equilíbrio, um teste de estabilidade de fases baseado no critério do plano tangente de Gibbs foi realizado para testar a estabilidade da fase líquida. O teste de estabilidade de fases utilizado neste trabalho foi o mesmo apresentado por Ferrari et al. (2009). Quando uma instabilidade da fase líquida foi encontrada, então um cálculo de separação da fase foi realizado, sendo considerada a fase orgânica como a fase reagente. O mesmo comportamento foi obtido por Voll et al. (2011) e resultados semelhantes foram observados. Para os cálculos do equilíbrio, foi utilizado o ácido oleico como um sistema modelo, e os parâmetros termodinâmicos dos componentes puros foram obtidos da literatura (VOLL et al., 2011).

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação da umidade dos substratos sólidos

O teor de umidade dos substratos sólidos foi determinado em balança de infravermelho (Gehaka IV 2000, São Paulo, Brasil). Para este ensaio, foi adicionado 1 g de amostra na balança, que foi programada com temperatura de 105°C, em modo de auto-secagem até variação da umidade menor do que 0,05% (m/m).

4.7.2 Determinação da atividade de hidrólise por método titulométrico

A dosagem de atividade lipolítica de hidrólise foi feita pelo método titulométrico, conforme metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações.

As emulsões empregadas nos ensaios foram preparadas com água destilada com a adição de Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 7,0), CaCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (150 mmol L⁻¹), goma arábica (3%, m/V) e 67 mmol L⁻¹ de substrato (tributirina, tricaprilina, trioleína, entre outros TAGs) (TISS; CARRIERE; VERGER, 2001). A solução foi emulsionada em um liquidificador Arno Optimix (Arno, São Paulo, Brasil) por 5 min, e por mais 1 min imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, 20 mL de emulsão e 50 mg de sólido fermentado (base seca) foram adicionados ao vaso de reação termostatizado (40°C) com agitação magnética. Os AGLs liberados pela hidrólise enzimática foram titulados em um titulador automático pH-Stat (Metrohm 718, Herisau, Suíça) durante 5 min, mantendo-se o pH em 7,0 com uma solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹. A atividade de hidrólise (A_H) foi calculada com a Equação 2.

$$A_H = \frac{\frac{dV}{dt} \times [\text{NaOH}] \times f \times F_{\text{pH}}}{M_{\text{SF}}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: dV/dt é a velocidade inicial do consumo de NaOH em mL min^{-1} ; $[\text{NaOH}]$ é a concentração de NaOH em $\mu\text{mol mL}^{-1}$; f é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional); M_{SF} é a quantidade de sólido fermentado (base seca) em gSS e F_{pH} é o fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial dos ácidos graxos da tributirina, tricaprilina e trioleína, que possuem um valor de pK_a de 4,57, 4,89 e 6,8, respectivamente. Para cada substrato, F_{pH} foi calculado com a Equação 3, considerando o pH do ensaio (7,0).

$$F_{\text{pH}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}}{10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}} \quad \text{Equação 3}$$

A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado (base seca) (U gSS^{-1}), sendo, uma unidade de atividade (U) a quantidade de enzima que promove a liberação de $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

4.7.3 Determinação da atividade de esterificação

Para o ensaio de atividade de esterificação, foram padronizadas a concentração dos substratos e as condições da reação. As reações foram feitas em frascos de vidro de 12 mL, contendo 500 a 800 mg de sólido fermentado delipidado e 10 mL de meio reacional, em um agitador orbital a 200 rpm, a 40°C . O meio reacional consistiu de 210 mmol L^{-1} de etanol e 70 mmol L^{-1} de ácido oleico, solubilizados em *n*-hexano. Alíquotas de $50 \mu\text{L}$ do meio reacional foram coletadas para a determinação da concentração de AGLs residuais pelo método colorimétrico de Lowry e Tinsley (1976), conforme descrito em 4.7.4.

Para os cálculos de atividade de esterificação, foi considerada a velocidade inicial do consumo de AGLs, que corresponde ao coeficiente angular da equação ajustada aos pontos iniciais (faixa de linearidade) de um gráfico de concentração de ácido graxo (μmol) versus tempo (min). A atividade de esterificação foi expressa em unidades de atividade por grama de sólido fermentado (base seca) (U gSS^{-1}), calculada a partir da Equação 4.

$$A_E = -\frac{dN_{AGL}}{dt} \times \frac{1}{M_{SF}} \quad \text{Equação 4}$$

onde: dN_{AGL}/dt é a velocidade do consumo de AGL em $\mu\text{mol min}^{-1}$ e M_{SF} é a quantidade de sólido fermentado em g (base seca), sendo, uma unidade (U) de atividade de esterificação enzimática definida como o consumo de 1 μmol de ácido graxo por minuto em meio orgânico, nas condições utilizadas no ensaio.

4.7.4 Determinação de ácidos graxos livres por método colorimétrico

Este método foi utilizado para quantificar o teor residual de AGLs durante a síntese de ésteres catalisada pelo sólido fermentado, em reações em frascos agitados, em presença de co-solvente. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre e os AGLs solúveis em fase orgânica (LOWRY; TINSLEY, 1976).

Para o ensaio, foram adicionados 50 μL da amostra (concentração máxima de ácido graxo de 80 mmol L^{-1}) em Eppendorfs de 2 mL contendo 1150 μL de *n*-hexano. Após agitação em vórtex por 20 s, foram adicionados 300 μL do reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre (II) (5%, m/V), com pH (6,0 a 6,2) ajustado previamente com piridina. A mistura foi agitada por 45 s em vórtex e centrifugada por 10 min a 3000 $\times g$ para separação das fases. A absorbância da fase orgânica foi lida a um comprimento de onda de 715 nm.

A concentração dos AGLs no meio foi relacionada à absorbância através de curvas de calibração feitas com soluções padrão do ácido graxo puro ou de mistura de AGLs, com concentrações de 0 a 80 mmol L^{-1} em *n*-hexano (conforme mostrado no Apêndice A). Vale ressaltar que o método original utiliza tolueno no lugar do *n*-hexano, mas como foi utilizado *n*-hexano como co-solvente, optou-se por substituir o tolueno por *n*-hexano por praticidade e por sua menor toxicidade. Esta modificação foi feita após verificar que os resultados obtidos com *n*-hexano foram iguais aos obtidos com tolueno.

4.7.4.1 Cálculo da conversão em éster em reações em presença de co-solvente

As conversões em éster (X) das reações de esterificação em presença de co-solvente foram calculadas de acordo com a Equação 5.

$$X(\%) = \frac{(C_0 - C_t) \times 100}{C_0} \quad \text{Equação 5}$$

onde: C_0 é a concentração dos AGLs no tempo zero em mmol L^{-1} e C_t é a concentração dos AGLs no tempo de reação analisado em mmol L^{-1} .

4.7.5 Determinação dos ácidos graxos livres e do índice de acidez por titulação ácido-base

Este método foi utilizado para quantificar o teor de AGLs das matérias-primas graxas e o teor de AGLs residuais durante a síntese de ésteres em SLC. Trata-se de um método de titulação alcalina baseado no método Ca 5a-40 da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 1989).

Para o ensaio, foram pesados em balança analítica de 50 a 100 mg de amostra em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. A massa exata foi anotada, e em seguida foram adicionados à amostra 20 mL de etanol previamente neutralizado e 2 gotas de solução indicadora (fenolftaleína 1% em etanol, m/V). Esta mistura foi homogeneizada e titulada com uma solução aquosa de NaOH ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), até o ponto de viragem do indicador (coloração rósea permanente por 30 s). O volume foi anotado, e o teor de AGLs (Teor_{AGL}) e o índice de acidez (IA) foram calculados pelas Equações 6 e 7, respectivamente.

$$\text{Teor}_{\text{AGL}}(\%) = \frac{V \times [\text{NaOH}] \times f \times \text{MM}_{\text{AGL}} \times 100}{m \times 1000}$$

Equação 6

$$\text{IA} \left(\frac{\text{mgKOH}}{\text{g}} \right) = \frac{V \times [\text{NaOH}] \times f \times \text{MM}_{\text{KOH}}}{m}$$

Equação 7

onde: Teor_{AGL} é o teor de ácidos graxos livres em percentual na amostra; IA é o índice de acidez expresso em mg de KOH necessários para neutralizar um grama de amostra; V é o volume da solução de hidróxido de sódio consumido na titulação em mL; $[\text{NaOH}]$ é a concentração da solução de NaOH em mol L^{-1} ; f é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional); m é a massa da amostra em g; MM_{KOH} é a massa molar de KOH ($56,11 \text{ g mol}^{-1}$); 1000 é o fator de conversão de g para mg; e MM_{AGL} é a massa molar de AGL. Por exemplo, para o ácido oleico foi utilizado o valor de $282,5 \text{ g mol}^{-1}$ e para a mistura de AGLs do óleo ácido da borra de soja foi utilizado o valor de $277,3 \text{ g mol}^{-1}$, que corresponde à massa molar média dos AGLs que compõem a amostra.

4.7.5.1 Cálculo da conversão em éster em reações livres de co-solvente

As conversões em éster das reações de esterificação em SLC foram calculadas de acordo com a Equação 8.

$$X(\%) = \frac{(\text{IA}_0 - \text{IA}_t) \times 100}{\text{IA}_0}$$

Equação 8

onde: IA_0 é o índice de acidez da amostra no tempo zero e IA_t é o índice de acidez da amostra no tempo de reação analisado.

4.7.6 Determinação do índice de iodo

O índice de iodo é a medida do grau de insaturação de um óleo ou gordura, e é expresso em g de iodo absorvido por 100 g de amostra ($\text{g I}_2/100 \text{ g}$). Este parâmetro influencia em fatores de qualidade do biodiesel, como estabilidade à oxidação, viscosidade e ponto de entupimento de filtro a frio, sendo importante para a seleção da matéria-prima. Para a determinação do índice de iodo foi utilizado o método de Wijs, segundo a metodologia Cd 1-25 da AOCS (1995). Foram adicionados de 200 a 800 mg de amostra (base seca), exatamente pesados, para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de clorofórmio. Após total solubilização da amostra, foram adicionados 25 mL do reagente de Wijs (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, o material foi misturado, tampado e mantido em repouso ao abrigo de luz durante 30 min, seguindo-se a adição de 20 mL de solução alcoólica de iodeto de potássio (100 g L^{-1}) e 100 mL de água destilada. A mistura foi então titulada com solução padronizada de tiossulfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até ponto de viragem (amarelo para branco). Paralelamente, foi realizado um controle (branco) nas mesmas condições, mas sem a amostra. O índice de iodo ($\text{g I}_2/100 \text{ g}$) foi calculado de acordo com a Equação 9.

$$\text{Índice de iodo} = \frac{(V_B - V_A) \times [\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \times f \times 1,27}{m} \quad \text{Equação 9}$$

onde: V_B é o volume em mL de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco; V_A é o volume em mL de solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação da amostra; $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3]$ é a concentração da solução de tiossulfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); f é o fator de correção da solução de tiossulfato de sódio padronizada (adimensional); m é a massa da amostra em gramas e 1,27 é o centiequivalente do iodo (adimensional).

4.7.7 Determinação do índice de saponificação

O índice de saponificação (IS) é definido como a quantidade de hidróxido de potássio em mg necessária para neutralizar os AGLs e saponificar os ésteres presentes em 1 g de amostra de óleo ou gordura. O índice de saponificação é um indicador para presença de contaminantes na amostra, que são substâncias insaponificáveis, e também para determinar a massa molar média dos ácidos graxos que compõem a amostra. Este ensaio foi baseado no método Cd 3-25 da AOCS (1990). Foi adicionado 1 g de amostra (base seca), exatamente pesado, em um balão de 250 mL diluindo-se a amostra em seguida com 25 mL de hidróxido de potássio em etanol ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). O balão foi então acoplado a um condensador de refluxo vertical e mantido em banho de água (100°C) durante 1 h. Após resfriamento do frasco, foram adicionados 40 mL de etanol (99,5%) pelo topo do condensador e 1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína (1%, m/V). Esta mistura foi homogeneizada e titulada com uma solução aquosa padronizada de HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), até o ponto de viragem do indicador (desaparecimento da coloração rósea). Paralelamente, foi realizado um controle (branco) nas mesmas condições, mas sem a amostra. O índice de saponificação em mg KOH por grama de amostra foi calculado pela Equação 10.

$$IS = \frac{(V_B - V_A) \times [HCl] \times f \times MM_{KOH}}{m} \quad \text{Equação 10}$$

onde: V_B é o volume em mL de solução de HCl gasto na titulação do branco; V_A é o volume em mL de solução de HCl gasto na titulação da amostra; $[HCl]$ é a concentração da solução de HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); m é a massa da amostra em gramas; f é o fator de correção da solução de HCl padronizada (adimensional) e MM_{KOH} é a massa molar de KOH ($56,11 \text{ g mol}^{-1}$).

4.7.8 Quantificação de água por Karl-Fischer

A determinação do teor de água foi feita por titulação potenciométrica, baseada no método Ca 2e-84 da AOCS (1997). Para as análises, foi utilizado um titulador automático, modelo Titroline 7500 (Polimate, SI Analytics, Mainz, Alemanha). Como titulante, foi utilizado o reagente de Karl-Fischer (Merck, Darmstadt, Alemanha), composto por uma solução de iodo e dióxido de enxofre em metanol anidro. O método consiste na redução do iodo e oxidação do dióxido de enxofre, com simultâneo consumo de água. Amostras de 10 a 100 mg foram pesadas e adicionadas no vaso do titulador contendo 30 mL de metanol anidro (Merck). O ponto final da titulação foi detectado automaticamente pela variação brusca da corrente elétrica. O teor de água (% em massa) foi determinado automaticamente pelo titulador, através da Equação 11.

$$\text{Água(\%)} = \frac{E_{KF} \times f \times V}{m} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

onde: E_{KF} é o equivalente em água do reagente de Karl Fischer (5 mg mL^{-1}); f é o fator de correção da calibração da solução de Karl Fischer (adimensional); V é o volume em mL da solução de Karl Fischer gasto na titulação e m é a massa exata da amostra analisada em miligramas.

4.7.9 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para verificar a presença de AGLs e ésteres, no sobrenadante das lavagens do sólido fermentado. Foram utilizadas como fase estacionária placas de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemanha) e na fase móvel uma mistura de *n*-hexano, éter etílico e ácido acético, na

proporção volumétrica de 70:29:1, respectivamente. Após a corrida, as cromatoplasmas foram reveladas com iodo.

4.7.10 Cromatografia gasosa

O método de cromatografia gasosa foi utilizado para determinação do perfil de ácidos graxos das matérias graxas, para quantificação dos etil-ésteres e do etanol de amostras provenientes das reações de esterificação. Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa, modelo GC-2010 (Shimadzu Co, Quioto, Japão), equipado com detector de ionização de chama (DIC), e coluna capilar Rtx®-Wax (Restek, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido. Foi injetado 1 µL de amostra previamente preparada com razão de *splitting* 1:50, utilizando nitrogênio como gás de arraste. Os cromatogramas foram registrados e analisados com um software da Shimadzu GC Solution (versão 2.3). O preparo das amostras e a programação de temperatura para cada metodologia estão descritos a seguir.

4.7.10.1 Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil em ácidos graxos das matérias-primas graxas utilizadas neste trabalho foi feito através da identificação dos metil-ésteres das amostras, por cromatografia em fase gasosa, baseado no método Ce 1-62 da AOCS (1997).

Para o preparo dos metil-ésteres, foram adicionados em um frasco de vidro com tampa de teflon 100 mg de AGL e 5 mL de uma solução metanólica de H₂SO₄ (75 mmol L⁻¹). A mistura foi agitada em agitador magnético e mantida por 10 min em um banho de água a 80°C. Em seguida, o frasco foi retirado do banho e aberto após resfriar para a adição de 5 mL de *n*-heptano. O frasco foi agitado manualmente e mantido a 60°C por 5 min. A mistura foi lavada três vezes com 10 mL de solução aquosa saturada de NaCl (para retirada da solução metanólica). Após lavagem, a fração orgânica (contendo os ésteres) foi filtrada em um papel de filtro qualitativo

contendo sulfato de sódio anidro para a retirada de umidade; 1 µL da amostra foi injetado no cromatógrafo.

Para a análise no cromatógrafo, as temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250°C. O aquecimento da coluna foi programado com temperatura inicial de 120°C, permanecendo por 2 min, seguida de aquecimento a 10°C min⁻¹ até 180°C, permanecendo por 3 min, seguida de aquecimento a 5°C min⁻¹ até 230°C, permanecendo por 15 min, conforme condição indicada pela norma EN14103 (2003).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) (conforme mostrado no Apêndice B). A quantificação foi feita por normalização das áreas obtidas por integração dos picos identificados nos cromatogramas, utilizando a Equação 12.

$$AG(\%) = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

onde: A_i é a área de cada pico de metil-éster e $\sum A$ é o somatório de todas as áreas dos picos de metil-ésteres.

4.7.10.2 Quantificação dos etil-ésteres

A quantificação dos etil-ésteres foi feita por cromatografia gasosa, por padronização interna e externa (Apêndice C). Inicialmente, foram preparadas amostras com uma mistura de ésteres padrão (palmitato, estearato, oleato e linoleato de etila) com diferentes concentrações (% em massa) em *n*-heptano. A cada amostra preparada, foram adicionados 10% (m/m) do padrão interno heptadecanoato de metila (>99,5%, Sigma-Aldrich) em relação à massa da amostra. Em seguida, 1 µL de cada solução preparada foi injetado pelo menos 3 vezes no cromatógrafo nas mesmas condições descritas em 4.7.10.1. Com as áreas obtidas nos cromatogramas, foi construído um gráfico com a razão da soma das áreas dos

picos de etil-ésteres pela área do pico do padrão interno, versus a concentração de etil-ésteres (% em massa) (conforme mostrado no Apêndice C).

Para a análise, 20 a 30 mg de amostra com teor de ésteres desconhecido foram diluídas em *n*-heptano, contendo 10% (m/m) do padrão interno em relação à massa da amostra. Em seguida, 1 µL da amostra preparada foi injetado no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas na injeção das amostras da curva de calibração.

O teor de etil-ésteres na amostra (C_{EE}) foi calculado pela Equação 13.

$$C_{EE}(\%) = ca \times \frac{\sum A_{EE}}{A_{PI}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

onde: *ca* é o coeficiente angular obtido pela curva de calibração; $\sum A_{EE}$ é o somatório de todas as áreas dos picos dos etil-ésteres e A_{PI} é a área do pico do padrão interno.

4.7.10.3 Quantificação do etanol

Para a quantificação do etanol, o cromatógrafo foi programado para temperaturas do injetor e do detector de 175°C e 250°C, respectivamente. O aquecimento da coluna foi programado com temperatura inicial de 50°C, permanecendo por 6 min, seguida de aquecimento a 20°C min⁻¹ até 250°C, permanecendo por 20 min.

O teor de etanol foi determinado por padronização interna e externa. Inicialmente, foram preparadas amostras com etanol padrão (>99,5%, Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações (% em massa) em acetona. A cada amostra preparada, foram adicionados 10% (m/m) do padrão interno *n*-propanol (>99,5%, Sigma-Aldrich) em relação à massa da amostra. Em seguida, 1 µL de cada amostra preparada foi injetado pelo menos 3 vezes no cromatógrafo. Com as áreas obtidas nos cromatogramas, foi construído um gráfico com a razão da área do pico de etanol pela área do pico do padrão interno, versus a concentração de etanol (% em massa) (conforme mostrado no Apêndice D).

Para a análise, 20 a 30 mg de amostra com teor de etanol desconhecido foram diluídas em acetona, contendo 10% (m/m) do padrão interno em relação à massa da amostra. Em seguida, 1 µL da amostra preparada foi injetado no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas na injeção das amostras da curva de calibração.

O teor de etanol (C_{Etanol}) na amostra foi calculado pela Equação 14.

$$C_{\text{Etanol}}(\%) = ca \times \frac{A_{\text{Etanol}}}{A_{\text{PI}}} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

onde: ca é o coeficiente angular da curva de calibração; A_{Etanol} é a área do pico do etanol e A_{PI} é a área do pico do padrão interno.

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os valores apresentados nos gráficos e tabelas deste trabalho correspondem às médias dos resultados, em duplicata ou triplicata, seguidas do erro padrão da média, calculado pela Equação 15.

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} / \sqrt{n} \quad \text{Equação 15}$$

onde: \bar{s} é o erro padrão da média; x_i é o valor de cada resultado individual (x_1, x_2, x_3); \bar{x} é a média aritmética dos valores x_i e n é o número de amostras.

Para comparar se duas amostras apresentavam diferenças estatísticas entre si, foi aplicado o teste t , com o auxílio das ferramentas de análise do Excell, com nível de significância de 5%. Assim, para um valor de $p > 0,05$ significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média das amostras e para $p < 0,05$ significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a média das amostras comparadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE EM ÁGUA SUBCRÍTICA

Foram utilizados neste trabalho ácidos graxos livres obtidos a partir da hidrólise em água subcrítica de diversas matérias graxas disponibilizadas pela empresa USDA (Ponta Grossa, PR, Brasil). Dentre as matérias graxas utilizadas, três são consideradas de baixo custo: o óleo ácido da borra de soja (resíduo proveniente do processo de refino de óleo de soja), OGR (proveniente de caixas de gordura de restaurante) e o sebo bovino (proveniente de graxaria). Além dessas fontes de baixo custo, foi utilizado também o óleo de soja como referência, por ser a matéria-prima mais utilizada atualmente para produção de biodiesel.

Nas matérias-primas de baixo custo foram encontrados teores de água entre 5 e 20%, e de AGLs entre 17 e 50% (Tabela 6). Como já relatado na literatura, matérias-primas com teores de água e AGLs acima de 1% não são adequadas para o processo tradicionalmente utilizado para síntese do biodiesel por transesterificação alcalina. No entanto, para o processo proposto neste trabalho é possível utilizar matérias graxas com qualquer teor de AGLs e água, uma vez que na etapa de hidrólise os TAGs são misturados com água formando glicerol e AGLs.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS MATÉRIAS GRAXAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

| | Óleo de soja bruto | Óleo ácido da borra de soja | Óleo de gordura residual | Sebo bovino |
|-------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------|
| Água (%) | 0,5 | 5 | 20 | 5 |
| Matéria graxa (%) | 99 | 90 | 75 | 90 |
| AGLs (%) | 2 | 50 | 17 | 18 |

As matérias-primas foram hidrolisadas em água subcrítica e destiladas, para a conversão dos TAGs remanescentes em AGLs e para a retirada de umidade, conforme descrito em 4.1. Após destilação, a composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa (4.7.10.1) (Tabela 7). Além da composição, foram determinados o teor de AGLs e os índices de iodo e saponificação, que são análises rotineiras para a escolha da matéria-prima na indústria de biodiesel.

TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDAS POR HIDRÓLISE EM ÁGUA SUBCRÍTICA

| Composição das amostras hidrolisadas (% de ácidos graxos) | | | | | |
|--|-------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| | | Óleo de soja bruto | Óleo ácido da borra de soja | Óleo de gordura residual | Sebo bovino |
| Ácido mirístico | C14:0 | - | 1,1 | 2,1 | 5,9 |
| Ácido palmítico | C16:0 | 7,9 | 14,1 | 22,0 | 30,5 |
| Ácido palmitoleico | C16:1 | 0,6 | - | 1,5 | 5,9 |
| Ácido esteárico | C18:0 | 4,8 | 3,6 | 4,4 | 10,0 |
| Ácido oleico | C18:1 | 30,1 | 33,4 | 35,6 | 45,3 |
| Ácido linoleico | C18:2 | 52,6 | 44,2 | 32,6 | 0,8 |
| Ácido linolênico | C18:3 | 3,1 | 2,3 | 1,0 | - |
| Outros AGLs | | 0,9 | 1,3 | 0,8 | 1,6 |
| Massa molecular média (g mol ⁻¹) | | 278,6 | 277,3 | 274,3 | 269,6 |
| AGLs (%) | | 95 | 97 | 95 | 96 |
| Índice de iodo (g I ₂ /100 g) | | 123 | 110 | 93 | 48 |
| Índice de saponificação (mg KOH g ⁻¹) | | 196 | 199 | 198 | 203 |
| Água (%) | | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,3 |

Todas as amostras apresentaram teor de AGLs maior do que 95%, indicando uma elevada conversão dos TAGs em AGLs. Os valores dos índices de saponificação foram próximos do valor de referência do óleo de soja refinado (189 a 195 mg KOH g⁻¹), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005), indicando a ausência de impurezas e massa molar média dos ácidos graxos próximas do óleo de soja. O índice de iodo e as análises por cromatografia gasosa indicaram a presença de ácidos graxos saturados e insaturados. Por exemplo, as misturas de AGLs do óleo ácido da borra de soja e de OGR apresentaram índices de iodo de 110 e 93 (g I₂/100 g), respectivamente, sendo

próximos do índice de iodo do óleo de soja (123 g I₂/100 g). No entanto, o valor do índice de iodo da mistura de ácidos graxos do sebo (48 g I₂/100 g) foi menos que a metade do índice de iodo do óleo de soja, devido a seu maior percentual de ácidos graxos saturados. Os principais ácidos graxos presentes nas misturas de ácidos graxos do óleo ácido da borra de soja e de OGR foram os ácidos palmítico, oleico e linoleico, que são também os principais ácidos graxos presentes no óleo de soja (Tabela 7).

O biodiesel obtido a partir de gorduras animais, em comparação com o biodiesel de origem vegetal, tem maior número de cetano e maior estabilidade à oxidação; por outro lado, a presença de grande quantidade de AGLs saturados de cadeia longa diminui a viscosidade e eleva o ponto de entupimento em filtro frio (LEBEDEVAS et al., 2006). Por isso, o uso de sebo animal puro não é indicado para a produção de biodiesel, mas este tem sido utilizado em misturas com o óleo vegetal para diminuir o custo e ainda diminuir o índice de iodo, melhorando assim a capacidade calorífica do biodiesel proveniente de óleos vegetais (DIAS; ALVIM-FERRAZ; ALMEIDA, 2009). A resolução brasileira da ANP nº 7/2008 (BRASIL, 2008) não estabelece um limite para o índice de iodo do biodiesel. No entanto, a norma europeia EN 14214 limita um valor máximo de 120 g I₂/100 g (European Standard, 2003). Considerando esta norma, os melhores resultados foram obtidos com os AGLs do óleo ácido da borra de soja e de OGR, que apresentaram índice de iodo intermediário (110 e 93, respectivamente), adequados para a produção de biodiesel.

5.2 SELEÇÃO DO MICRO-ORGANISMO PRODUTOR DE LIPASE

Inicialmente, as cepas de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 foram utilizadas para produção de lipases por FES. Os sólidos fermentados produzidos a partir destes micro-organismos foram utilizados anteriormente, no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, e apresentaram potencial para catalisar reações de esterificação e transesterificação (SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010). No entanto, não tinham sido realizados estudos com a aplicação destes sólidos fermentados em reações de esterificação em sistema livre de co-solvente (SLC). Por isso, neste trabalho, foi verificado

inicialmente o potencial da aplicação dos sólidos fermentados de *B. cepacia* (SFBC) e *R. microsporus* (SFRM) em reações de esterificação etílica em SLC.

5.2.1 Produção dos sólidos fermentados

A otimização da produção de SFBC e SFRM com atividade lipolítica foi previamente feita por Salum et al. (2010) e Zago (2010), respectivamente. Por isso, inicialmente, os sólidos fermentados foram produzidos nas mesmas condições já utilizadas por estes autores, conforme procedimentos descritos em 4.2.3 e 4.2.4. Conforme mostrado na Tabela 8, os valores das atividades de hidrólise contra a trioleína de SFBC (39 U gSS^{-1}) e de SFRM (41 U gSS^{-1}) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$), e similares aos valores de atividade de 32 e 38 U gSS^{-1} relatados por Salum et al. (2010) e Zago (2010), respectivamente.

TABELA 8 - ATIVIDADES DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 E *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

| Substratos | Atividade (U gSS^{-1}) | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | (1) <i>B. cepacia</i> | (2) <i>R. microsporus</i> |
| Trioleína TC18:1 (hidrólise) | $39,0 \pm 1,7$ | $41,3 \pm 0,2$ |
| Ácido oleico e etanol (esterificação) | $3,9 \pm 0,4$ | $6,9 \pm 0,2$ |

Condições de cultivo: 10 g de substrato seco (bagaço de cana e farinha de semente de girassol, 1:1, m/m); (1) *B. cepacia*: umidade inicial 75%, 96 h a 29°C ; (2) *R. microsporus*: umidade inicial 80%, 18 h a 40°C . Dosagem de atividade: hidrólise - método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0; esterificação: 500 mg de sólido fermentado delipidado, 10 mL de meio reacional (210 mmol L^{-1} de etanol e 70 mmol L^{-1} de ácido oleico em *n*-hexano), 40°C e 200 rpm. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

A atividade de esterificação ($6,9 \text{ U gSS}^{-1}$) de SFRM foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) quando comparada com a atividade ($3,9 \text{ U gSS}^{-1}$) de SFBC. Com este resultado, o SFRM mostrou ser mais ativo que SFBC em reações de esterificação. No entanto, o método utilizado para determinação da atividade de esterificação foi realizado com uma baixa concentração de substratos em presença

do co-solvente *n*-hexano (96% em relação ao volume reacional total). Segundo Foresti e Ferreira (2005), um biocatalisador pode ser mais ativo em sistemas reacionais com co-solvente, mas pode ser desativado em SLC, onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da reação. Assim, foram feitos experimentos adicionais em sistemas com diferentes concentrações de substratos para selecionar o sólido fermentado que resultasse em uma maior produtividade em éster, principalmente em SLC.

5.2.2 Comparação entre os sólidos fermentados de *Burkholderia cepacia* e *Rhizopus microsporus* na síntese de ésteres etílicos

As conversões das reações de esterificação em sistemas com 96% de co-solvente (em relação ao volume reacional total), catalisadas por SFBC e SFRM, foram de 92% (8 h de reação) e 93% (4 h de reação), respectivamente (Tabela 9). A reação catalisada com SFBC levou o dobro do tempo para atingir a mesma conversão comparada à reação catalisada por SFRM. Por outro lado, com o aumento da concentração dos substratos em 14 (sistema com 51% de co-solvente) e 29 vezes (SLC), a velocidade da reação de esterificação catalisada por SFBC foi maior (82% de conversão em 88 h) quando comparada com a reação catalisada por SFRM (28% de conversão em 48 h). Não foi observada conversão nas reações controle feitas com os sólidos fermentados autoclavados, onde as lipases estão inativas.

A produtividade é uma variável dependente do tempo, e pode atingir valores máximos em conversões baixas. Por exemplo, para SFBC, a máxima produtividade em éster na reação com 51% de co-solvente foi de $153 \text{ mg}_{\text{éster}} \text{ gSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com apenas 20% de conversão (dados não mostrados), e diminuiu para $114 \text{ mg}_{\text{éster}} \text{ gSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com 80% de conversão (Tabela 9). Baixas conversões não são interessantes industrialmente devido à geração de etapas adicionais de recuperação, que consequentemente irão diminuir a produtividade e aumentar o custo do processo. Assim, para os cálculos de produtividade neste estudo, foram considerados os tempos de reação com conversões maiores do que 80%. Para as reações onde não

foram atingidas conversões acima de 80%, as produtividades foram calculadas quando foi atingida conversão máxima (Tabela 9).

TABELA 9 - PRODUTIVIDADES EM ÉSTER DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 E *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM

| Meio reacional | 96% (V:V) de <i>n</i> -hexano | 51% (V:V) de <i>n</i> -hexano | livre de <i>n</i> -hexano |
|---|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>Burkholderia cepacia</i> | | | |
| Tempo (conversão em éster) | 8 h; (91,8 ± 1,0%) | 44 h; (81,0 ± 0,7%) | 88 h; (82,1 ± 4,1%) |
| Produtividade (mg _{éster} gSS ⁻¹ h ⁻¹) | 49,9 ± 0,8 | 114,2 ± 1,4 | 118,0 ± 8,3 |
| <i>Rhizopus microsporus</i> | | | |
| Tempo (conversão em éster) | 4 h; (93,1 ± 0,9%) | 52 h; *(48,9 ± 0,7%) | 48 h; *(28,3 ± 1,5%) |
| Produtividade (mg _{éster} gSS ⁻¹ h ⁻¹) | 101,2 ± 1,4 | *58,3 ± 1,2 | *74,5 ± 5,6 |

Condições: 500 mg de sólido fermentado delipidado, 40°C e 200 rpm. Meios reacionais: 10 mL (etanol:ácido oleico, mmol) - 96% (V/V) de *n*-hexano (2,1:0,7); 51% (V/V) de *n*-hexano (30,0:10,0); livre de *n*-hexano (61,2:20,4). *As produtividades foram calculadas com a máxima conversão obtida (Equação 1, 4.2.6). Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

A produtividade da reação catalisada por SFBC, quando comparada com SFRM, foi menor apenas em meio com alta concentração de co-solvente (96%, V:V). Com o aumento da concentração dos substratos e eliminação do co-solvente, as produtividades em éster foram maiores nas reações catalisadas com SFBC, que foi escolhido para a continuação deste trabalho.

5.3 ESTUDOS COM O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia*

5.3.1 Efeito do tamanho das partículas do biocatalisador na atividade de esterificação

O tamanho das partículas é um fator importante quando se trabalha com FES, pois influencia na difusão de gases no meio e no crescimento do micro-organismo (PANDEY et al., 1999). Devido à heterogeneidade do tamanho das partículas do bagaço de cana utilizado na fermentação, um estudo tornou-se necessário para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Para tanto, o bagaço de cana *in natura* foi tamisado para determinação da distribuição do tamanho das partículas (Tabela 10). Observou-se que o lote de bagaço de cana utilizado como substrato dos cultivos por FES foi composto por 51,1% de partículas maiores do que 2,36 mm e 9,5% de partículas menores do que 0,85 mm. A faixa intermediária, composta por partículas entre 0,85 e 2,36 mm, correspondeu a 39,4%.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO BAGAÇO DE CANA *IN NATURA*

| Abertura (mm) | Peneira (mesh) | Fração % (em massa) |
|---------------|----------------|---------------------|
| < 0,85 | 20 | 9,5 ± 2,2 |
| 0,85 a 1,00 | 20 a 18 | 10,1 ± 1,1 |
| 1,00 a 1,40 | 18 a 14 | 7,0 ± 0,6 |
| 1,40 a 1,70 | 14 a 12 | 9,4 ± 0,1 |
| 1,70 a 2,00 | 12 a 10 | 5,6 ± 0,6 |
| 2,00 a 2,36 | 10 a 8 | 7,1 ± 2,1 |
| > 2,36 | 8 | 51,1 ± 3,4 |

Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Visto que o tamanho das partículas influencia na atividade do sólido fermentado (SALUM et al., 2010, ZAGO, 2010), no presente trabalho foi avaliada a sua influência na atividade de esterificação de SFBC. Foram comparadas as atividades de SFBC preparado nas seguintes condições (Tabela 11): (a) FES com bagaço de cana não tamizado; (b) FES com bagaço de cana tamizado antes da fermentação (0,85 a 2,36 mm); (c) sólido fermentado tamizado após FES (0,85 a 2,36 mm); (d) fração do sólido fermentado maior do que 2,36 mm, moída e tamizada (0,85 a 2,36 mm). Em todas as fermentações foram utilizadas partículas de 0,85 mm a 2,36 mm de farinha de semente de girassol, na proporção de 1:1 (m/m) com bagaço de cana. O valor de recuperação apresentado na Tabela 11 é referente ao percentual do substrato sólido já fermentado aproveitado após as diferentes preparações.

TABELA 11 - ATIVIDADES DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 OBTIDO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DO SÓLIDO

| Preparação | | Atividade (U gSS ⁻¹) | Recuperação do sólido fermentado (%) |
|---------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| Antes da fermentação | (a) sólido com bagaço de cana não tamizado | 4,9 ± 0,4 | 100 |
| | (b) sólido com bagaço de cana tamizado (0,85 a 2,36 mm) | 6,5 ± 0,7 | 100 |
| Após fermentação | (c) fração do sólido fermentado tamizado (0,85 a 2,36 mm) | 7,3 ± 1,0 | 76 |
| | (d) fração do sólido fermentado maior do que 2,36 mm, moída e tamizada (0,85 a 2,36 mm) | 5,9 ± 0,1 | 87 |

Condições de cultivo: 10 g de substrato seco (bagaço de cana e farinha de semente de girassol, 1:1, m/m), umidade inicial 75%, 96 h a 29°C; granulometria da farinha de semente de girassol (0,85 mm a 2,36 mm). Atividade de esterificação: 500 mg de sólido fermentado delipidado, 10 mL de meio reacional (210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico em *n*-hexano), 40°C e 200 rpm. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

As maiores atividades de esterificação foram obtidas com a fração intermediária (0,85 a 2,36 mm) de SFBC produzido com o bagaço de cana tamisado antes da fermentação ($6,5 \text{ U gSS}^{-1}$) e com SFBC tamisado após fermentação ($7,3 \text{ U gSS}^{-1}$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as atividades de SFBC produzido nestas condições. A menor atividade de esterificação ($4,9 \text{ U gSS}^{-1}$) foi obtida com SFBC produzido sem tamisação do bagaço. No entanto, após moagem da fração superior a 2,36 mm e tamisação para recuperação da fração intermediária (0,85 a 2,36 mm) foi possível aumentar a atividade para $5,9 \text{ U gSS}^{-1}$, mas neste procedimento foram recuperados apenas 87% do sólido fermentado produzido. Assim, optou-se por tamisar o bagaço antes da fermentação, e utilizar partículas entre 0,85 a 2,36 mm para a produção de SFBC. Desta maneira, foi possível utilizar 100% do sólido fermentado.

5.3.2 Cinética da produção do sólido fermentado com atividade lipolítica

Para verificar se o tempo de fermentação de 96 h, habitualmente utilizado, estava adequado para o novo preparo do substrato definido acima, foi estudada a cinética da produção do sólido fermentado com atividade de hidrólise (trioleína) e de esterificação (ácido oleico e etanol), conforme metodologias descritas em 4.7.2 e 4.7.3, respectivamente. SFBC apresentou maiores atividades de hidrólise e de esterificação, a partir de 48 h até 96 h de fermentação (Figura 13). A máxima atividade de esterificação ($5,8 \pm 0,4 \text{ U gSS}^{-1}$) foi obtida com 72 h de fermentação e a máxima atividade de hidrólise ($91,6 \pm 3,3 \text{ U gSS}^{-1}$) com 96 h de fermentação. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas atividades ($p > 0,05$) no período de 48 a 96 h de fermentação; por outro lado, em 120 h, observou-se uma diminuição significativa das atividades ($p < 0,05$) em relação a 96 h de fermentação.

Salum et al. (2010) obtiveram maior atividade de hidrólise com SFBC produzido em 96 h de fermentação, mas no presente trabalho, optou-se pelo tempo de 72 h, tendo em vista que este tempo encontra-se no meio do intervalo com as maiores atividades de hidrólise e de esterificação de SFBC, e também por reduzir em 24 h o tempo de fermentação habitualmente utilizado.

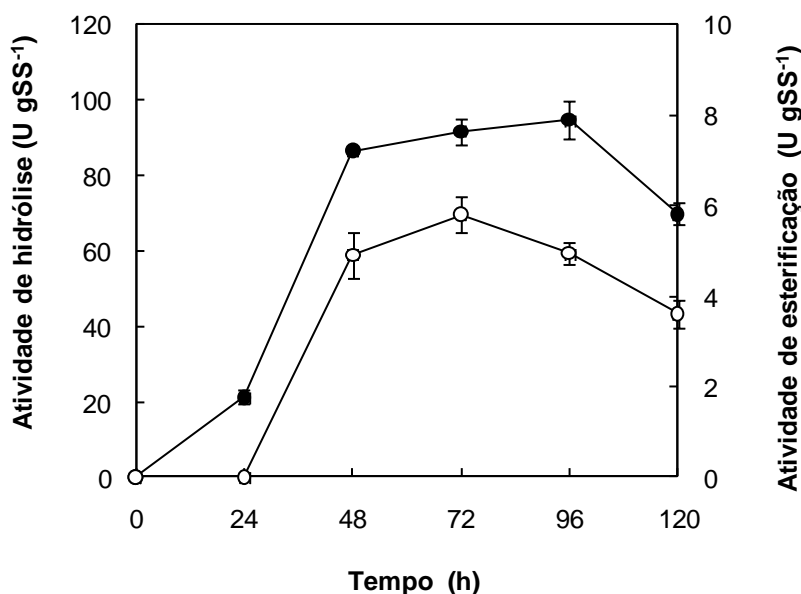


FIGURA 13 - PERFIL DAS ATIVIDADES DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 DURANTE O CULTIVO

Dosagem de atividade: (●) hidrólise – método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0; (○) esterificação: 800 mg de sólido fermentado delipidado, 10 mL de meio reacional (210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico em *n*-hexano), 40°C e 200 rpm. Condições de cultivo: 10 g de substrato seco (bagaço de cana e farinha de semente de girassol, 1:1, m/m, granulometria das partículas - 0,85 mm a 2,36 mm), umidade inicial 75%, 29°C. Os valores plotados são as médias dos frascos em duplicata ± o erro padrão da média.

5.3.3 Efeito da secagem do sólido fermentado

A produção de sólido fermentado em grande escala requer um processo de secagem mais econômico e menos dispendioso do que o de liofilização, habitualmente utilizado em escala de laboratório. Foram avaliados métodos de secagem mais simples, como a secagem em estufa com ventilação a 30°C e a secagem em coluna com fluxo de ar seco (desumidificado) em temperatura ambiente (25°C). Os resultados foram comparados por medidas de atividade de hidrólise contra trioleína (4.7.2) do sólido fermentado úmido (72% de umidade) e do sólido fermentado seco (umidade menor que 10%). Vale ressaltar que, no início da fermentação, a umidade do sólido foi ajustada para 75%, mas após 72 h de fermentação, a umidade do sólido fermentado diminuiu para 72%.

O sólido fermentado úmido (controle) apresentava antes da secagem atividade de hidrólise de 83 ± 5 U gSS⁻¹ (Figura 14). Esta atividade foi

estatisticamente igual ($p > 0,05$) após a secagem em coluna com fluxo de ar seco, a 25°C por 5 h ($84 \pm 6 \text{ U gSS}^{-1}$) e após liofilização a -4°C por 24 h ($90 \pm 4 \text{ U gSS}^{-1}$). O único processo que provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) da atividade ($37 \pm 5 \text{ U gSS}^{-1}$, 55% de perda de atividade) foi a secagem em estufa a 30°C (Figura 14).

Estudos similares de secagem de sólidos fermentados foram encontrados na literatura apenas para cultivos com micro-organismos do gênero *Rhizopus* sp. Por exemplo, Martinez-Ruiz et al. (2008) verificaram uma perda na atividade enzimática de um sólido fermentado de *Rhizopus* sp. IRD43aIV de 17 e 18%, após secagem por fluxo de ar e liofilização, respectivamente. Alberton et al. (2010) também constataram perda da atividade de 32% de um sólido fermentado de *R. microsporus*, o mesmo utilizado no início deste trabalho, após secagem por liofilização. Estes resultados indicam que SFBC seja mais estável ao processo de secagem comparado a SFRM.

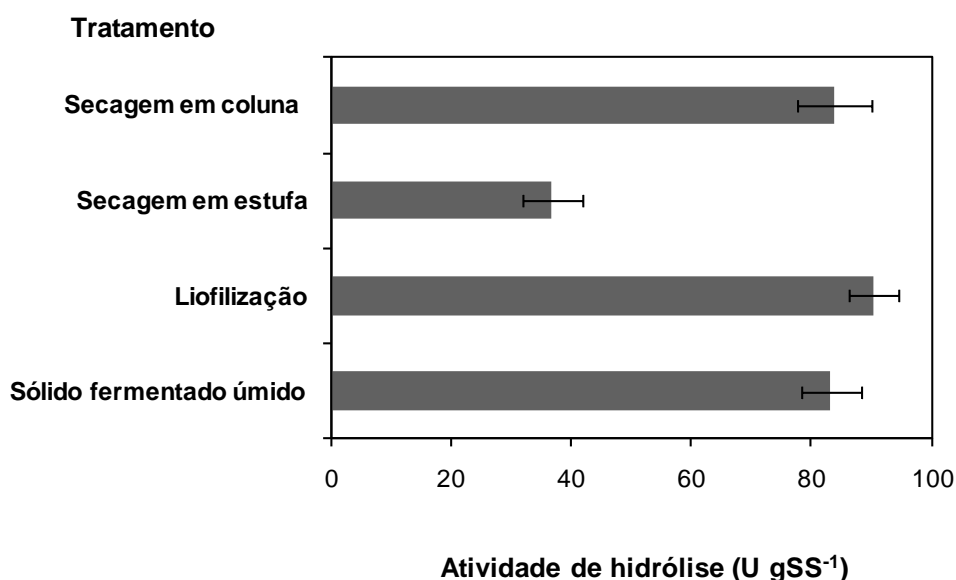


FIGURA 14 - EFEITO DA SECAGEM NA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

Condições da secagem: coluna - 200 g de sólido úmido, fluxo de ar ascendente 20 L min⁻¹, 5 h em temperatura ambiente; estufa - 200 g de sólido úmido, 8 h a 30°C; liofilização -24 h, a -45°C e 0,1 mbar. Atividade de hidrólise: método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Visto que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os processos de secagem por liofilização e em coluna com fluxo de ar seco, este foi selecionado para a secagem de SFBC, porque além de manter a atividade do sólido, é um processo mais econômico que o de liofilização e não necessita da etapa de congelamento. Neste sistema, foi possível secar 200 g de sólido em 5 h, com retirada de 12,6% de umidade por hora de secagem (Figura 15).

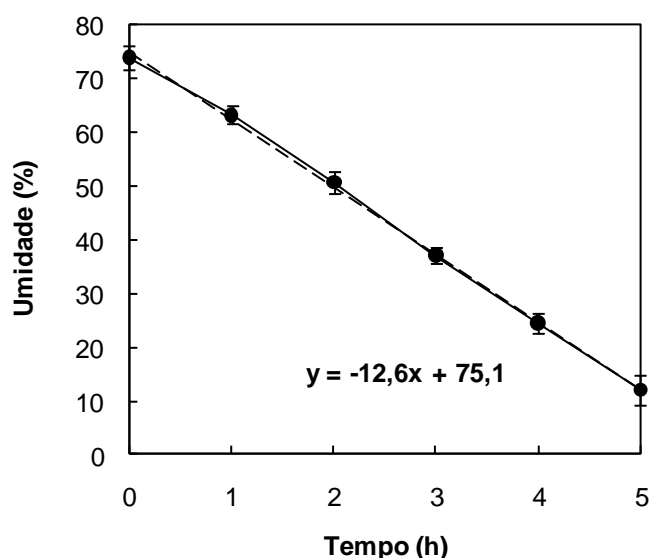


FIGURA 15 - CINÉTICA DA SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO

Condições da secagem: 200 g de sólido úmido, fluxo de ar ascendente 20 L min⁻¹, temperatura ambiente. Dosagem de umidade: 1 g de sólido, 105°C, balança de infravermelho. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

5.3.4 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco durante o armazenamento

Para verificar a estabilidade da atividade, amostras de SFBC seco, armazenadas a 4°C e em temperatura ambiente, foram periodicamente coletadas para determinação da atividade de hidrólise contra trioleína (4.7.2). A atividade de hidrólise (88 ± 7 U gSS⁻¹) de SFBC armazenado a 4°C foi mantida por 12 meses, e em temperatura ambiente foi mantida por 8 meses, caindo apenas 10% após

12 meses (Figura 16). Vale ressaltar que o sólido fermentado seco foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram armazenados em potes plásticos, para evitar contato com ar e umidade, minimizando a contaminação por crescimento microbiano.

Observou-se que a estabilidade da atividade de SFBC foi excelente, mesmo em temperatura ambiente, incentivando sua aplicação em escala industrial. Estudos similares foram feitos com SFRM seco por liofilização, onde foram relatadas perdas de apenas 5% e 15% da atividade do sólido após armazenamento a 4°C, por 3 e 12 meses, respectivamente (RASERA, 2012; ZAGO, 2010). No entanto, quando armazenado em temperatura ambiente, foi relatada uma perda de 30% da atividade em apenas 30 dias (RASERA, 2012).

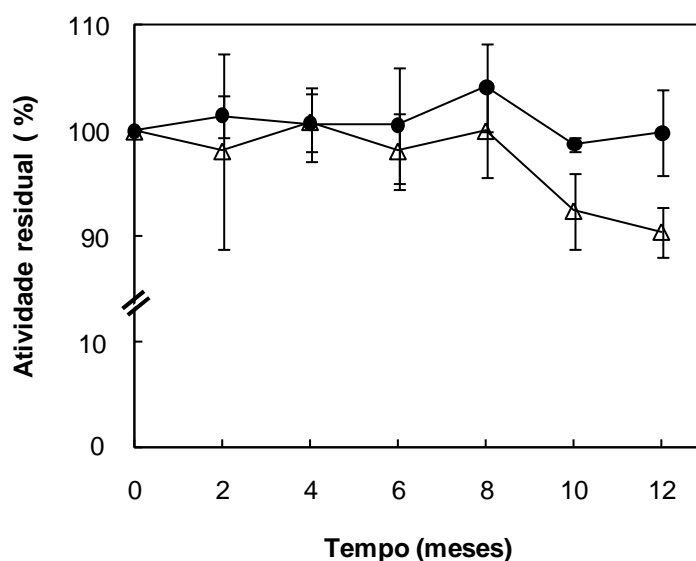


FIGURA 16 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO SECO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Condições do armazenamento: (●) 4°C; (Δ) temperatura ambiente. Atividade de hidrólise residual: percentagem da atividade inicial do sólido fermentado (88 U gSS⁻¹), determinada por método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0.. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

5.3.5 Estabilidade da atividade do sólido fermentado seco em meio reacional de síntese

A lipase imobilizada de *B. cepacia* é conhecida pela sua estabilidade em solventes orgânicos (LIU et al., 2011; LIU et al., 2010; PAN et al., 2010). No entanto, a estabilidade desta lipase naturalmente imobilizada no sólido fermentado tinha sido determinada previamente apenas em etanol, onde 80% da atividade de hidrólise de SFBC foram mantidos após 24 h de incubação, a 30°C e 180 rpm (SALUM, 2010).

No presente trabalho, foi estudada a estabilidade da atividade lipolítica de SFBC após incubação por 48 h a 40°C nos meios reacionais de síntese e em solventes isolados. As atividades residuais de hidrólise foram calculadas em relação à atividade de hidrólise contra trioleína do sólido fermentado sem incubação (4.1.6).

A atividade residual de SFBC foi mantida acima de 95% após 8 h de incubação em 100% de etanol e em SLC (contendo 61,2 mmol de etanol e 20,4 mmol de ácido oleico) (Figura 17). Em *n*-hexano puro e em meio reacional contendo 96% de *n*-hexano (V/V), 210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, ocorreu um aumento significativo da atividade em relação ao controle (atividade de SFBC sem incubação) ($p < 0,05$) nas primeiras 4 h de incubação. Esta ativação pode ter ocorrido devido à hidrofobicidade do *n*-hexano, que pode manter a lipase em sua conformação aberta, facilitando o acesso dos substratos ao sítio ativo da enzima. Este comportamento também foi relatado para a lipase comercial de *B. cepacia* (Amano) após incubação por 2 h a 20°C, em *n*-hexano e *n*-heptano (LIU et al., 2010). Em outro estudo, a mesma lipase apresentou atividade residual de 80 a 120% após incubação em metanol, etanol e acetona, por 4 h em temperatura ambiente (LIU et al., 2011). Comparado com estes estudos, SFBC apresentou 100% de atividade em tempo (8 h) e temperatura (40°C) maiores de incubação. A partir de 8 h, a atividade residual foi diminuindo, mas mesmo após 48 h foi mantida acima de 77% em etanol, 73% em SLC e 83% em *n*-hexano e no meio reacional de síntese contendo *n*-hexano.

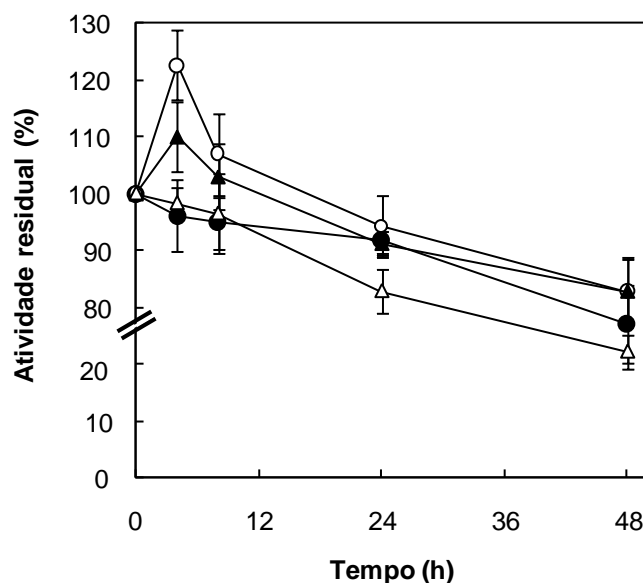


FIGURA 17 - ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 APÓS INCUBAÇÃO EM SOLVENTES ORGÂNICOS PUROS E EM MEIOS REACIONAIS DE SÍNTESE

Atividade residual: (●) etanol; (○) *n*-hexano; (▲) meio reacional com 96% (V/V) de *n*-hexano (210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico); (Δ) SLC (61,2 mmol de etanol e 20,4 mmol de ácido oleico). Condições: 500 mg de sólido fermentado, 10 mL de meio, 40°C e 200 rpm. Atividade de hidrólise residual: percentagem da atividade inicial do sólido fermentado (84 U gSS⁻¹), determinada por método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

5.3.6 Produção do sólido fermentado em diferentes tamanhos de frascos

Inicialmente, os cultivos foram feitos em Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de uma mistura de farinha de semente de girassol e bagaço de cana (1:1, m/m, base seca). Nos ensaios preliminares de esterificação, feitos em frascos agitados, foram utilizados em cada reação 500 a 800 mg (base seca) de SFBC, mas para os experimentos em leito fixo eram necessários 12 g de SFBC em cada reação. Devido à relativamente grande quantidade de sólido fermentado utilizado para os estudos em reatores de leito fixo, foi necessário aumentar sua produção. Com o objetivo de tornar a produção de SFBC menos dispendiosa, foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyers maiores, aumentando proporcionalmente a quantidade de substrato sólido e inóculo. Observou-se que este procedimento não prejudicou a produção de lipases, pois não houve diferença estatisticamente significativa

($p > 0,05$) entre as atividades dos sólidos fermentados produzidos em diferentes tamanhos de frascos (250, 500 e 2000 mL) (Tabela 12). A produção de SFBC foi aumentada em apenas oito vezes (frascos de 2000 mL), onde foi possível autoclavar e inocular o sólido. No entanto, este aumento contribuiu positivamente para a produção de maior quantidade de sólido para as próximas etapas deste trabalho.

TABELA 12 - ATIVIDADES DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 PRODUZIDO EM DIFERENTES TAMANHOS DE FRASCOS

| Dimensões do frasco Erlenmeyer (mL) | Quantidade de sólido fermentado (base seca, gSS) | Atividade de hidrólise (U gSS^{-1}) |
|-------------------------------------|--|--|
| 250 | 10 | $76,1 \pm 0,2$ |
| 500 | 20 | $86,6 \pm 12,7$ |
| 2000 | 80 | $78,2 \pm 2,3$ |

Condições de cultivo: substrato seco (bagaço de cana e farinha de semente de girassol, 1:1, m/m, granulometria das partículas - 0,85 mm a 2,36 mm), umidade inicial 75%, 72 h a 29°C. Atividade de hidrólise: método titulométrico com trioleína, a 40°C e pH 7,0. Os valores apresentados são as médias dos frascos em duplicata \pm o erro padrão da média.

Visto que a atividade do sólido fermentado seco foi mantida por um longo período de armazenamento, foram produzidos novos lotes de SFBC em quantidade suficiente para os estudos em reator de leito fixo. Com o objetivo de manter a reprodutibilidade nos experimentos, todos os lotes foram secos (até umidade de 10% m/m) e misturados, completando 1 kg de SFBC (base seca). Esse lote apresentou atividade de hidrólise de $87 \pm 9 \text{ U gSS}^{-1}$ (com trioleína, 4.7.2), e atividade de esterificação de $6,3 \pm 0,1 \text{ U gSS}^{-1}$ (com ácido oleico e etanol, 4.7.3) e foi utilizado nos experimentos de síntese de ésteres relatados a seguir.

5.4 SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* EM SISTEMA LIVRE DE CO-SOLVENTE

Ensaio preliminares de reações de esterificação foram feitos em frascos agitados, com o objetivo de definir a quantidade de SFBC a ser adicionada na reação. Além disso, foram determinadas as atividades de esterificação com diversos AGLs comerciais e obtidos por hidrólise em água subcrítica (5.1), com o intuito de selecionar o substrato para as reações em reator de leito fixo.

5.4.1 Efeito da quantidade de sólido fermentado na reação de esterificação

Reações de esterificação com diferentes quantidades de SFBC (9, 12 e 15% em relação à massa de ácido oleico) foram comparadas em relação à conversão e produtividade em éster (Figura 18). As velocidades iniciais e as produtividades em éster aumentaram com o aumento da quantidade de SFBC de 9 para 12% (Figura 18). No entanto, o aumento da quantidade de SFBC de 12 para 15% não aumentou significativamente a produtividade ($p > 0,05$) e a velocidade inicial da reação. Por exemplo, após 50 h de reação utilizando 12 e 15% de sólido fermentado foram obtidas conversões de 80% e produtividades em éster de 135 e 112 mg gSS⁻¹ h⁻¹, respectivamente, enquanto que utilizando 9% de sólido foram obtidas conversão de apenas 35% e produtividade de 85 mg gSS⁻¹ h⁻¹. Assim, a proporção de 12% de SFBC (em relação à massa do AGL) foi adotada para os próximos experimentos.

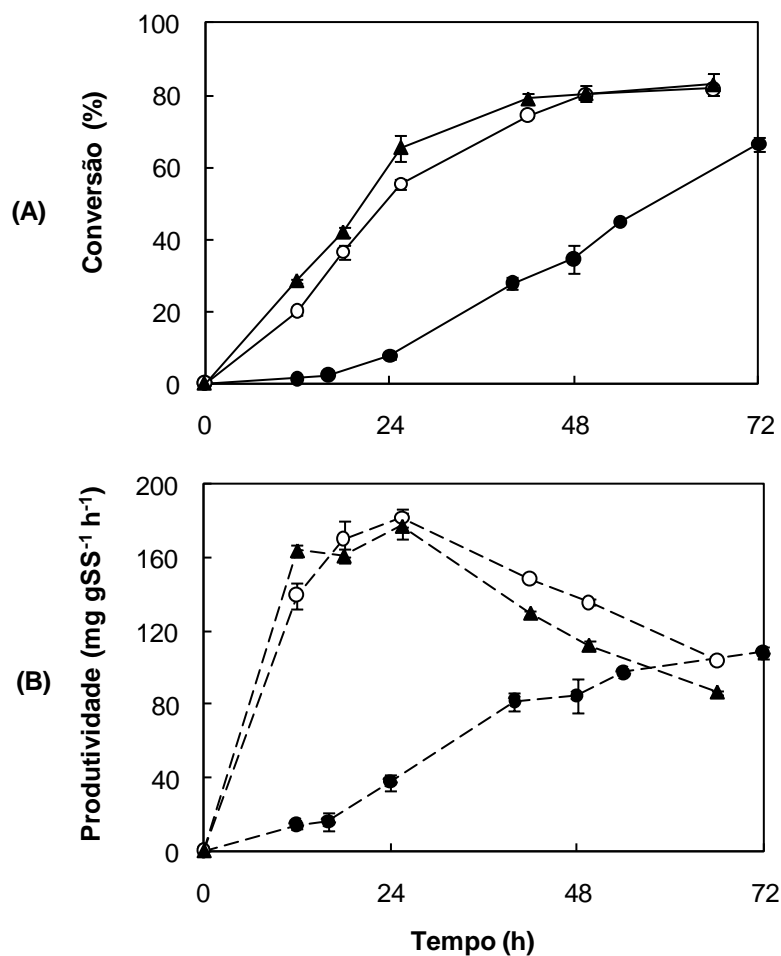


FIGURA 18 - EFEITO DA QUANTIDADE DE SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

(A) Conversão em éster (%); (B) Produtividade em éster (mg gSS⁻¹ h⁻¹). Legenda: (●) 9%; (○) 12% e (▲) 15% de massa de sólido fermentado (em relação à massa de ácido oleico utilizada). Condições: mistura reacional em SLC (61,2 mmol de etanol e 20,4 mmol de ácido oleico), a 40°C e 200 rpm. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

5.4.2 Atividade do sólido fermentado frente a diferentes substratos em reações de hidrólise e de esterificação

A atividade de SFBC foi avaliada com diferentes TAGs por atividade de hidrólise (4.7.2) e com diferentes AGLs por atividade de esterificação (4.7.3). Observou-se que a lipase possui maior atividade hidrolítica com TAGs de cadeia média (tricaprilina, 258 U gSS⁻¹) e curta (tributirina, 300 U gSS⁻¹) (Figura 19). No caso de misturas de TAGs, como sebo, azeite de oliva, óleos de girassol, canola e

soja, as atividades hidrolíticas foram similares com a atividade obtida contra trioleína ($81 \pm 6 \text{ U gSS}^{-1}$), que é um substrato de cadeia longa utilizado para identificar a presença de lipases (JAEGER; REETZ, 1998). Estes resultados estão de acordo com a literatura. Sugihara et al. (1992) constataram que a lipase de *P. cepacia* hidrolisa TAGs compostos por ácidos graxos com cadeia menor do que 12 carbonos, com velocidade mais alta comparada a TAGs com cadeia de ácidos graxos longa, mostrando maior afinidade por substratos de cadeia média.

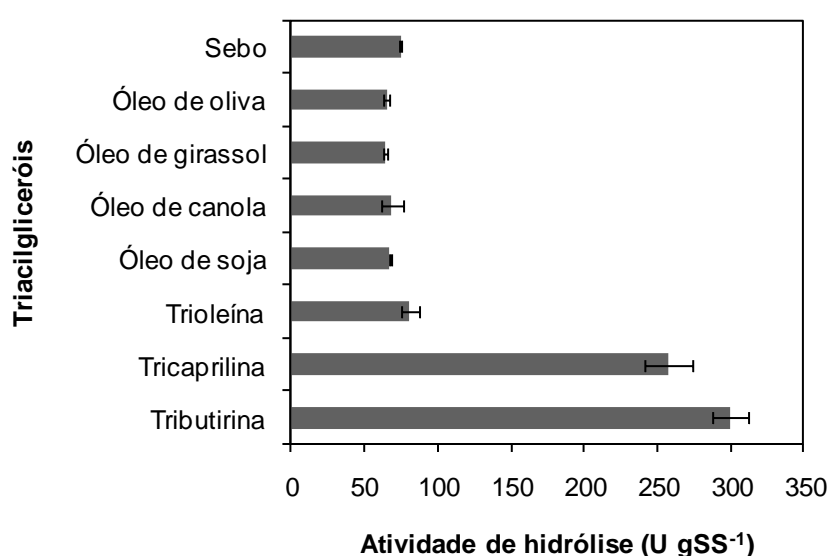


FIGURA 19 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 FRENTE A DIFERENTES TRIACILGLICERÓIS

Dosagem de atividade: método titulométrico, a 40°C e pH 7,0. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata \pm o erro padrão da média.

A atividade de esterificação (Figura 20) foi avaliada com diferentes AGLs puros (ácidos caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico e linoleico) e misturas de AGLs (sebo, óleo ácido da borra de soja, óleos e gorduras residuais) obtidas por hidrólise em água subcrítica (Tabela 7). A atividade de esterificação de SFBC não foi relacionada diretamente ao tamanho da cadeia acila dos AGLs puros (Figura 20), sendo maior para os ácidos palmítico ($12,7 \text{ U gSS}^{-1}$) e caprílico ($11,7 \text{ U gSS}^{-1}$). Maiores atividades de esterificação com o ácido palmítico também foram obtidas com uma lipase de *P. cepacia* (LPS A001526) em sistemas de microemulsão

AOT/ iso-octano (STAMATIS et al., 1995) e com uma lipase de *B. cepacia* (LPS AR01520) imobilizada em Accurel EP-100 (PENCREAC'H; BARATTI, 1999).

Dentre as misturas de AGLs testadas, a maior atividade de esterificação foi obtida utilizando AGLs do óleo ácido da borra de soja (7,0 U gSS⁻¹). O baixo custo (HAAS et al., 2003) desta matéria-prima é interessante para produção de biodiesel. Assim, esse substrato foi escolhido para os experimentos em reator de leito fixo.

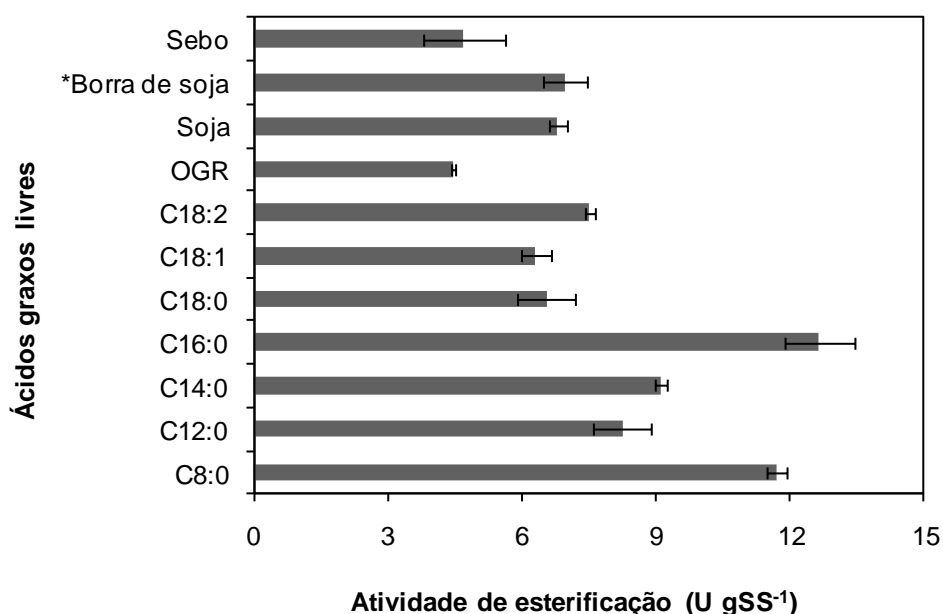


FIGURA 20 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 FRENTE A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

*Ácidos graxos livres do óleo ácido da borra de soja. Dosagem de atividade: 800 mg de sólido fermentado delipidado, 10 mL de meio reacional (210 mmol L⁻¹ de etanol e 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico em *n*-hexano), 40°C e 200 rpm. Os valores apresentados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

5.5 ESTUDOS DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EM REATOR DE LEITO FIXO

Como relatado na revisão da literatura, vários autores têm utilizado reatores de leito fixo com enzimas imobilizadas para produção de biodiesel, devido às diversas vantagens econômicas e operacionais deste sistema, comparado com

reatores com agitação. Não foram encontrados processos de produção de ésteres metílicos ou etílicos em leito fixo, a partir de reações de esterificação enzimática utilizando misturas de AGLs como substrato. A esterificação de AGLs em leito fixo pode ser vantajosa, em relação à transesterificação, devido à ausência do glicerol, que pode ficar adsorvido no suporte, reduzindo a eficiência da reação. Este fenômeno tem sido bastante relatado, e ocorre devido à insolubilidade do glicerol no meio reacional, que pode formar uma camada hidrofílica na superfície do suporte, deixando a lipase inacessível aos substratos hidrofóbicos (SALUM et al., 2010; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000; DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999).

Com o objetivo de aumentar a produtividade da reação de esterificação, foram feitos estudos de otimização da reação em leito fixo com AGLs provenientes do óleo ácido da borra de soja, relatados a seguir.

Para os ensaios preliminares, foram utilizados 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja e 50 g de etanol, equivalentes a razão molar 3:1 (etanol:AGL). Os substratos foram continuamente recirculados pelo leito contendo 12 g de SFBC (base seca), conforme descrito em 4.5 (Figura 11).

5.5.1 Efeito da temperatura

Temperaturas na faixa de 40 a 60°C têm sido utilizadas em reações catalisadas pela lipase de *B. cepacia* imobilizada. Como por exemplo, na reação de transesterificação do óleo de soja com SFBC (SALUM et al., 2010), na transesterificação do óleo de mamona com a lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em polipropileno (Accurel EP100) (BARON et al., 2014), na transesterificação do sebo bovino e do óleo de babassu pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) (DA ROS et al., 2010), e na esterificação do ácido láurico pela lipase comercial de *P. cepacia* da Amano (LIU et al., 2010).

Esta faixa de temperatura foi então selecionada para as reações de esterificação do óleo ácido da borra de soja com etanol no reator de leito fixo preenchido com SFBC, utilizado neste trabalho. Observou-se que a velocidade inicial

da reação aumentou com o aumento da temperatura (Figura 21). No entanto, a 60°C, a conversão obtida em 24 h foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparada com as conversões obtidas a 40 e 50°C, provavelmente devido à desnaturação parcial da enzima. As maiores conversões (92% em 31 h e 93% em 46 h) foram obtidas na temperatura de 50°C. Nas temperaturas de 40 e 60°C foram obtidas conversões de 85% em 40 h de reação.

O aumento da temperatura de 40 para 50°C foi favorável para o aumento da velocidade da reação, pois contribuiu com a redução da viscosidade do meio reacional, aumentando a energia cinética dos substratos e facilitando a difusão. Por outro lado, o aumento da temperatura de 50 para 60°C foi prejudicial devido ao longo período de exposição da enzima nesta temperatura, que pode ter desnaturado a enzima. Concluiu-se que a melhor temperatura, para a reação de esterificação em leito fixo catalisada por SFBC foi de 50°C.

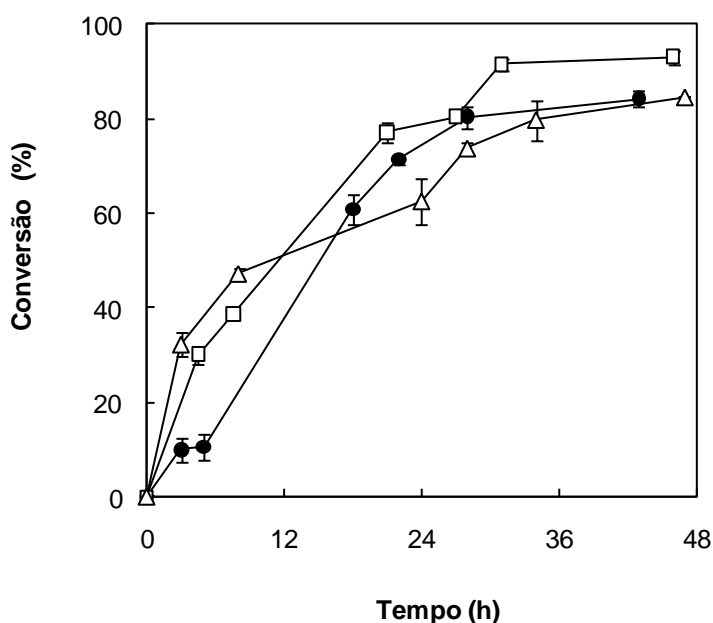


FIGURA 21 - EFEITO DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO

Temperatura da reação: (●) 40°C; (□) 50°C; (△) 60°C. Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca), 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 50 g de etanol (razão molar etanol:AGL, 3:1), vazão de recirculação 5 mL min⁻¹. Os valores plotados são as médias das análises em duplicata ± o erro padrão da média.

5.5.2 Efeito da vazão de recirculação da mistura reacional através do leito fixo

O efeito de diferentes vazões de recirculação da mistura reacional através do leito fixo (2, 5 e 10 mL min⁻¹) foi avaliado em relação à conversão dos AGLs em éster. Em todas as reações foram obtidas conversões significativamente iguais (92 a 93%; $p > 0,05$) em 48 h de reação (Figura 22). Este resultado indica que a variação da faixa de vazão utilizada não foi suficiente para influenciar na conversão em éster determinada em 48 h. As conversões não foram acompanhadas antes deste período, portanto não foi verificada a influência da vazão na velocidade inicial da reação. Salum et al. (2010) também não observaram diferenças na conversão da reação de transesterificação do óleo de soja em diferentes vazões de recirculação (0,25 a 2 mL min⁻¹) em um reator de leito fixo preenchido com o sólido fermentado de *B. cepacia*.

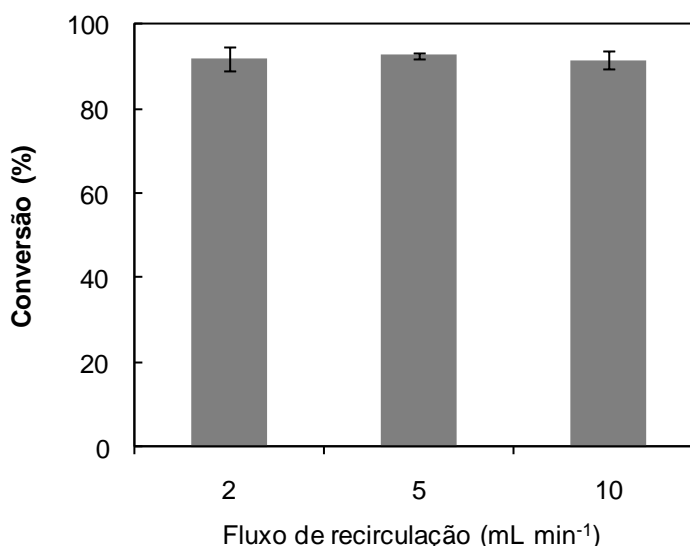


FIGURA 22 - EFEITO DA VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO NA CONVERSÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO

Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca), 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 50 g de etanol (razão molar etanol:AGL, 3:1), 50°C. Os valores plotados são as médias das análises em duplicata \pm o erro padrão da média.

Foram encontrados na literatura apenas estudos de reações de transesterificação em reatores de leito fixo preenchidos com enzimas imobilizadas. As faixas de vazão de recirculação estudadas foram muito variadas e este parâmetro fica restrito às condições utilizadas em cada trabalho, devido aos diferentes tamanhos dos reatores, volumes operacionais e características das enzimas imobilizadas utilizadas. Por exemplo, Halim, Kamaruddin e Fernando (2009) utilizaram uma faixa de vazão de recirculação de 0,2 a 1,0 mL min⁻¹ da mistura reacional através de um reator de leito fixo de 8 mL de volume útil, enquanto que Hajar et al. (2009) utilizaram uma faixa de vazão de recirculação de 2,0 a 8,0 mL min⁻¹ em um reator de leito fixo de 14 mL de volume útil. Em outro estudo, foi utilizada uma faixa de vazão de recirculação de 1,0 a 5,0 mL min⁻¹ em um reator de leito fixo de 136 mL de volume útil (WANG et al., 2011). Maiores conversões foram obtidas para vazões de recirculação intermediária na faixa estudada de cada trabalho. Por exemplo, Halim, Kamaruddin e Fernando (2009) obtiveram melhores resultados com uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, enquanto que Hajar et al. (2009) e Wang et al. (2011) obtiveram maiores conversões quando utilizaram vazões de recirculação de 6,0 e 2,0 mL min⁻¹, respectivamente.

De maneira geral, em baixas vazões de recirculação, menores conversões da reação de transesterificação são relatadas provavelmente devido à limitação de transferência de massa e ao aumento da camada hidrofílica de glicerol adsorvido na superfície do suporte, deixando a lipase inacessível aos substratos (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAJAR et al., 2009; HAMA et al., 2007). Além disso, o álcool não reagido migra da mistura reacional para a camada de glicerol na superfície do suporte, resultando em inativação da enzima pela alta concentração de álcool na camada hidrofílica (WATANABE et al., 2000). Alguns autores têm verificado que aumento da vazão facilita a transferência de massa e diminui a camada de glicerol adsorvida na superfície do suporte, aumentando assim a conversão (HAMA et al., 2011a; HAMA et al., 2011b). No entanto, vazões muito altas também podem levar a conversões mais baixas devido à diminuição da interação dos substratos com o sítio ativo da lipase (WANG et al., 2011; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAJAR et al., 2009; HAMA et al., 2007).

5.5.3 Reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação

A capacidade de reutilização de enzimas é um importante fator que interfere diretamente na produtividade, e consequentemente no custo do processo biocatalisado. Assim, foi feito um estudo de reutilização de SFBC em reações de esterificação por sucessivos ciclos de 48 h cada. Inicialmente, o estudo de reutilização foi feito na temperatura de 50°C (Figura 23). Nesta temperatura, a conversão obtida no primeiro ciclo (92%) foi mantida por três ciclos, e no quinto ciclo, a conversão foi mantida acima de 84% (que corresponde a 90% da conversão obtida no primeiro ciclo de reação), completando 240 h de tempo total de uso de SFBC.

Com o objetivo de manter a máxima conversão por um número maior de ciclos, o estudo de reutilização de SFBC foi repetido na temperatura de 45°C, onde a conversão foi mantida acima de 84% no sexto ciclo (um ciclo a mais do que a 50°C), completando 288 h de tempo total de uso de SFBC (Figura 23).

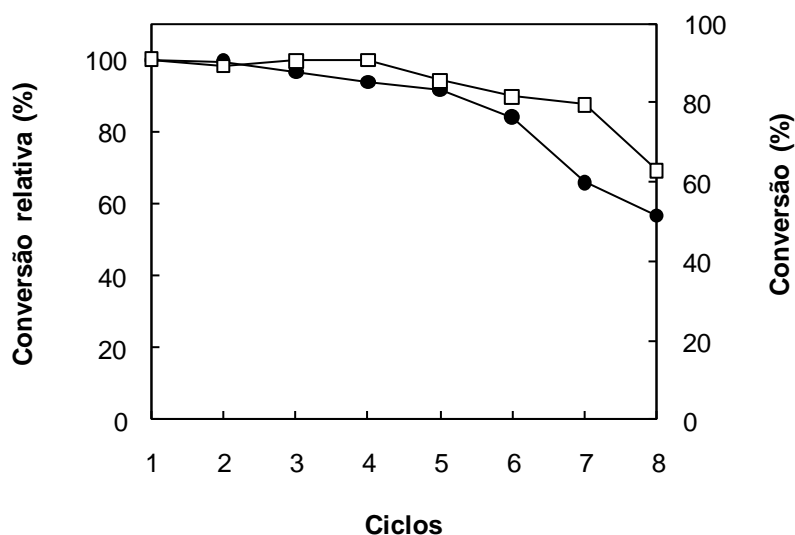


FIGURA 23 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO

Temperatura da reação de reutilização: (□) 45°C; (●) 50°C. Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca), 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 50 g de etanol (razão molar etanol:AGL, 3:1), vazão de recirculação 5 mL min⁻¹, ciclos de 48 h. Conversão relativa: percentagem da conversão de 92% obtida no primeiro ciclo.

A produção de éster em cada ciclo da reação de esterificação foi calculada a partir da conversão obtida. No primeiro ciclo foram produzidos 104 g de éster, e até o oitavo ciclo, foram acumulados 716 g de éster na reação a 50°C e 768 g na reação a 45°C, com apenas 12 g de SFBC. A reutilização possibilitou o aumento da produção de éster por g de SFBC. Por exemplo, no primeiro ciclo da reação a 45°C foram produzidos 9 g de éster por g de SFBC ($\text{g}_{\text{éster}}\text{g}_{\text{SFBC}}^{-1}$) e com as sucessivas reutilizações de SFBC foi possível produzir até o oitavo ciclo $64 \text{ g}_{\text{éster}}\text{g}_{\text{SFBC}}^{-1}$.

Alguns estudos de reutilização de sólidos fermentados do gênero de *Burkholderia* já foram relatados na literatura para reações de esterificação em frascos agitados e transesterificação em leito fixo e em frascos agitados (FERNANDES, 2007; SALUM et al., 2010; LIU et al., 2013). O sólido fermentado de *B. cepacia* utilizado neste trabalho apresentou um ótimo resultado no ensaio de reutilização, comparado com os resultados já relatados na literatura (Tabela 13). Neste estudo, a conversão obtida no primeiro ciclo (92%) foi mantida por 4 ciclos, equivalente a 192 h de uso, e diminuiu para 84% após 288 h de uso (6 ciclos).

TABELA 13 - ESTUDOS DE REUTILIZAÇÃO DE SÓLIDOS FERMENTADOS DO GÊNERO *Burkholderia*

| | Fernandes (2007) | Salum et al. (2010) | Liu et al. (2013) | Este trabalho |
|--------------------------------------|--|---|---|---|
| Sólido fermentado | <i>B. cepacia</i> | <i>B. cepacia</i> | <i>B. cenocepacia</i> | <i>B. cepacia</i> |
| Reação | Esterificação | Transesterificação | Transesterificação | Esterificação |
| Substratos | etanol:ácido oleico em <i>n</i> -heptano (96%, V/V) | etanol:óleo de soja (SLC) | etanol:óleo de soja em <i>t</i> -butanol (40%, V/V) | etanol:AGLs do óleo ácido da borra de soja (SLC) |
| Condições | Frascos agitados (200 rpm, 37°C) | Leito fixo (50°C) | Frascos agitados (200 rpm, 40°C) | Leito fixo (45°C) |
| Duração do ciclo (h) | 6 | 47 | 96 | 48 |
| Ciclo-conversão (tempo total de uso) | 1º - 97% (6 h) 10º - 97% (60 h) 14º - 48% (84 h) | 1º - 95% (47 h) 3º - 95% (141 h) 6º - 62% (282 h) 9º - 50% (423 h) | 1º - 71% (96 h) 3º - 48% (288 h) | 1º - 92% (48 h) 4º - 92% (192 h) 6º - 84% (288 h) 8º - 64% (384 h) |

No estudo de reutilização do sólido fermentado de *B. cepacia* em reações de esterificação em presença de co-solvente (FERNANDES, 2007), a conversão obtida no primeiro ciclo (97%) foi mantida por 10 ciclos (60 h de uso), diminuindo para 48% após 84 h de uso (14 ciclos). Observou-se que a conversão obtida no primeiro ciclo da reação de esterificação em presença de co-solvente foi mantida por um número maior de ciclos quando comparado com o número de reutilizações da reação em SLC, obtido neste trabalho. No entanto, a conversão com o tempo de uso foi menor, mesmo em temperaturas menores (37°C) (Tabela 13). A presença do *n*-heptano deveria contribuir para o aumento da estabilidade da lipase de *B. cepacia* (LIU et al., 2010). Um fator que pode ter contribuído para a manutenção da conversão por um maior tempo de uso no reator de leito fixo, é a menor tensão de cisalhamento imposta neste sistema comparada com a reação em frascos agitados mecanicamente.

Comparados com estudos de reutilização em reações de transesterificação, os resultados obtidos neste trabalho também foram melhores. Por exemplo, Liu et al. (2013) obtiveram 71% de conversão no primeiro ciclo da reação de transesterificação catalisada por um sólido fermentado de *B. cenocepacia*, que diminuiu para 48% após 288 h de uso (3 ciclos) (Tabela 13). Salum et al. (2010) fizeram um estudo similar de reutilização do sólido fermentado de *B. cepacia* em reações de transesterificação em SLC em reator de leito fixo. Neste estudo, a conversão obtida no primeiro ciclo (95%) foi mantida por 3 ciclos (141 h de uso), diminuindo para 62% após 282 h de uso (6 ciclos), enquanto que em 288 h de uso, a conversão obtida neste trabalho foi de 84%.

Os melhores resultados obtidos na reutilização do sólido fermentado em reações de esterificação, quando comparados com a reutilização em reações de transesterificação podem ser explicados pela ausência do glicerol, que é formado apenas na reação de transesterificação. Salum (2010) verificou que 98% do glicerol produzido na reação ficaram adsorvidos no sólido fermentado, contribuindo para a redução da conversão durante as reutilizações. Como relatado anteriormente, outros autores verificaram que o glicerol forma uma camada hidrofílica na superfície do suporte, deixando a lipase inacessível aos substratos (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; HAMA et al., 2007; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; WATANABE et al., 2000).

5.5.4 Produtividade da reação de esterificação

A produtividade (mg de éster produzido em 1 h, por 1 g de catalisador) da reação foi calculada a partir da conversão obtida e comparada com a produtividade de outros estudos de síntese de ésteres do biodiesel catalisados por sólidos fermentados e células inteiras. A comparação direta da produtividade com outros estudos é dificultada devido à falta de informação, padronização e clareza dos parâmetros necessários para os cálculos, como conversão, tempo, quantidade de substrato e quantidade de catalisador. Devido à estas dificuldades, as produtividades mostradas na Tabela 14 foram calculadas e padronizadas a partir dos dados fornecidos pelos autores, conforme Equação 1 descrita em 4.2.6.

A produtividade obtida neste trabalho ($272 \text{ mg}_E \text{ g}_{\text{cat}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi maior quando comparada com as produtividades obtidas nos estudos de síntese de ésteres do biodiesel catalisados por sólidos fermentados e células inteiras apresentados na Tabela 14. De maneira geral, as maiores produtividades foram obtidas para as reações de esterificação quando comparadas com as de transesterificação utilizando o mesmo catalisador. Por exemplo, neste estudo foi obtido uma produtividade 1,8 vezes maior do que a obtida por Salum et al. (2010) na reação de transesterificação do óleo de soja catalisada pelo sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11. Zago (2010) utilizou o sólido fermentado de *Rhizopus microsporus* em reações de esterificação do ácido oleico e transesterificação do óleo de milho em presença de *n*-heptano e obteve uma produtividade 1,4 vezes maior na reação de esterificação. Qin et al. (2008) também obtiveram maior produtividade ($154 \text{ mg}_E \text{ g}_{\text{cat}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na reação de esterificação do ácido oleico catalisada por células inteiras de *Rhizopus chinensis*, comparada com a produtividade ($114 \text{ mg}_E \text{ g}_{\text{cat}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) obtida na transesterificação do óleo de soja com o mesmo catalisador.

Assim como ocorreu no estudo de reutilização, melhores resultados foram obtidos nas reações de esterificação quando comparados com as de transesterificação catalisadas por sólidos fermentados. Supõe-se que a ausência do glicerol na reação de esterificação também esteja contribuindo para o aumento da produtividade. Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa são mais miscíveis em álcoois de cadeia curta do que os triacilglicerois, promovendo uma maior interação entre os substratos e o sítio ativo das lipases. Em relação à estequiometria e

balanço de massa, são produzidos uma maior quantidade (em massa) de éster a partir de ácido graxo quando comparado com a mesma quantidade inicial de triacilglicerol. Por exemplo, supondo 100% de conversão na síntese de oleato de etila, a partir de 100 g de trioleína são produzidos 105 g de oleato de etila, enquanto que a partir de 100 g de ácido oleico são produzidos 110 g de oleato de etila.

TABELA 14 - ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL COM APLICAÇÃO DIRETA DE SÓLIDOS FERMENTADOS E CÉLULAS INTEIRAS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

| | Lipases | Suporte catalisador (g) | Ácido/ Óleo | Álcool ¹ (RM) Co-solvente | Conversão Produtividade (mg _E g _{cat} ⁻¹ h ⁻¹) | Referência |
|----------------------|--|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------|
| Esterificação | <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | ² SF ³ (BC+FSG) (12 g) | AGLs da borra de soja (361 mmol) | Etanol (3:1) Ausência | 92%/ 31 h (272) | ESTE TRABALHO |
| | <i>Rhizopus microsporus</i> | ² SF ⁴ (BC) (1,6 g) | Ácido oleico (30 mmol) | Etanol (10:1) Ausência | 98%/ 48 h (119) | BOTTON et al. (2013) |
| | <i>Rhizopus microsporus</i> | ² SF ³ (BC+FSG) (1,5 g) | Ácido oleico (1,05 mmol) | Etanol (3:1) <i>n</i> -Heptano | 98%/ 3 h (71) | ZAGO (2010) |
| | <i>Rhizopus chinensis</i> | Células inteiras (0,77 g) | Ácido oleico (10,0 mmol) | Metanol (1:1) Ausência | 96%/ 24 h (154) | QIN et al. (2008) |
| | <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | ² SF ⁵ (FM) (0,27 g) | Ácido oleico (0,35 mmol) | Etanol (5:1) <i>n</i> -Heptano | 94%/ 18 h (21) | FERNANDES et al. (2007) |
| **Transesterificação | <i>Burkholderia cenocepacia</i> | ² SF ³ (BC+FSG) (1,5 g) | Óleo de soja (15 mmol) | Etanol (4:1) <i>t</i> -Butanol | 86%/ 96 h (82) | LIU et al. (2013) |
| | ⁶ <i>Rhizomucor miehei</i> recombinante | Células inteiras (0,4 g) | Óleo de soja (0,84 mmol) | Metanol (4,5:1) <i>iso</i> -Octano | 83%/ 72 h (21) | HUANG et al. (2012) |
| | <i>Rhizopus microsporus</i> | ² SF ³ (BC+FSG) (3 g) | Óleo de milho (35 mmol) | Etanol (3:1) <i>n</i> -Heptano | 57%/ 120 h (51) | ZAGO (2010) |
| | <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 | ² SF ³ (BC+FSG) (3 g) | Óleo de soja (24 mmol) | Etanol (3:1) Ausência | 95%/ 46 h (152) | SALUM et al. (2010) |
| | <i>Rhizopus chinensis</i> | Células inteiras (0,77 g) | Óleo de soja (8,4 mmol) | Metanol (3:1) Ausência | 86%/ 72 h (114) | QIN et al. (2008) |

¹RM: razão molar (álcool:ácido graxo ou óleo); ²SF: sólido fermentado; ³(BC+FSG) mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; ⁴BC: bagaço de cana; ⁵FM: farelo de milho; ⁶*Rhizomucor miehei* expressando lipase de *Pichia Pastoris*. As produtividades foram calculadas conforme Equação 1 (4.2.6), considerando a massa molar dos ésteres formados. Massa molar (g mol⁻¹): etil-ésteres do óleo ácido da borra de soja (305); oleato de etila (310); oleato de metila (297); etil-ésteres do óleo de soja (306); metil-ésteres do óleo de soja (292); etil-ésteres do óleo de milho (306). **Para a transesterificação, o número de mols do óleo convertido foi multiplicado por 3, conforme estequiometria da reação.

5.5.5 Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação

Com o objetivo de definir a faixa de trabalho para o estudo da razão molar dos substratos (etanol:AGL), em reator de leito fixo, foram feitas inicialmente reações de esterificação em frascos agitados. Neste estudo, observou-se uma diminuição da velocidade inicial da reação de esterificação com o aumento da razão molar dos substratos (Figura 24). Foram obtidos 88% de conversão nas razões molares (etanol:AGL) 1:1 e 3:1, e 60% na razão molar 5:1 em 48 h de reação.

O aumento da concentração do álcool em uma reação de esterificação reversível contribui para o deslocamento do equilíbrio a favor da produção de ésteres. No entanto, em reações catalisadas por enzimas, o resultado geralmente é inverso, ou seja, o aumento da concentração do álcool pode contribuir para a desnaturação da enzima (SHIMADA et al., 2002). Além disso, o etanol pode se ligar reversivelmente ao sítio ativo da enzima, causando inibição competitiva diminuindo a velocidade da reação (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005).

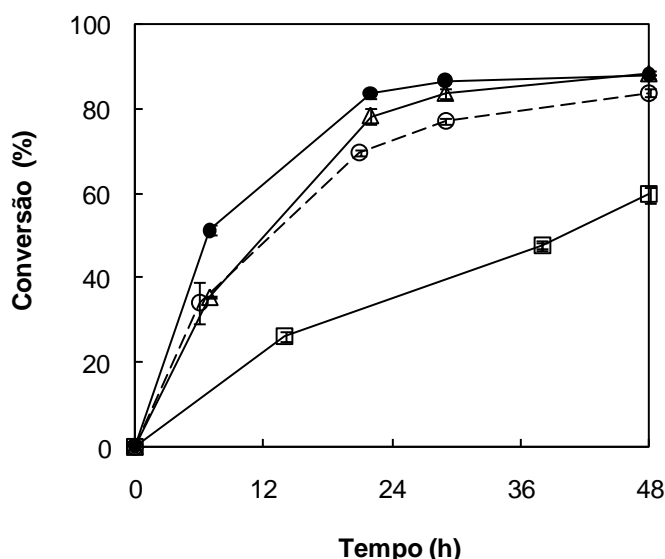


FIGURA 24 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM FRASCOS AGITADOS

Razão molar (etanol:AGL): (●) 1:1, (Δ) 3:1, (□) 5:1, (○) 1:1 (linha descontínua - conversão da reação catalisada pelo sólido fermentado que foi recuperado após reação com razão molar de 5:1). Condições: 610 mg de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 5085 mg de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 845, 2534 e 4223 mg de etanol, equivalentes a razão molar (etanol:AGL) de 1:1, 3:1 e 5:1, respectivamente, a 45°C e 200 rpm. Os valores plotados são as médias das análises em duplicata \pm o erro padrão da média.

Para verificar os efeitos de desnaturação ou inibição, SFBC que foi utilizado na reação com razão molar (etanol:AGL) 5:1 foi recuperado e reutilizado em uma nova reação com razão molar 1:1. Na reação de reutilização (representada pela linha descontínua, Figura 24) foi observado um aumento na velocidade da reação e na conversão de 60 para 84% (em 48 h), quando comparado à primeira reação feita com razão molar 5:1. Estes resultados sugerem que o etanol esteja competindo reversivelmente pelo sítio ativo da enzima. Parece improvável que a enzima tenha desnaturado (mesmo reversivelmente), porque, com o aumento da razão molar, a reação continuou ocorrendo a uma velocidade menor, mas constante, indicando que a enzima está ativa. Além disso, a atividade de SFBC foi mantida após incubação em etanol por 8 h, conforme resultados relatados anteriormente (item 5.3.5, Figura 17).

Visto que ocorreu inibição competitiva pelo etanol, optou-se em continuar os estudos de esterificação no reator de leito fixo com razões molares de etanol:AGL entre 1:1 e 3:1, onde os efeitos inibitórios do etanol foram menores quando comparados com a reação com razão molar 5:1.

5.6 ESTUDO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Como relatado na revisão da literatura, poucos trabalhos analisam as reações de síntese de biodiesel por esterificação do ponto de vista termodinâmico (VOLL et al., 2011; FORESTI et al., 2008; BUCALÁ et al., 2006; SANDOVAL et al., 2002). No entanto, o conhecimento da conversão de equilíbrio de uma reação é importante para verificar se a conversão obtida experimentalmente condiz com a conversão de equilíbrio na temperatura utilizada. Além disso, a abordagem termodinâmica pode ser uma ferramenta valiosa para entender mais profundamente um sistema biocatalisado e quais fatores podem interferir no equilíbrio. Este tipo de abordagem nunca foi feito com reações catalisadas por sólidos fermentados. A inexistência de dados teóricos que descrevam os fatores que afetam o equilíbrio destas reações, assim como a complexidade estrutural deste biocatalisador, motivou um estudo no que diz respeito aos aspectos de equilíbrio termodinâmico e de fases

para que se interfira de maneira mais eficiente nas condições reacionais. Para isto, foram feitas reações em reator de leito fixo nas razões molares (etanol:AGL) 1:1, 1,5:1 e 3:1. Os substratos foram mantidos no reservatório sob constante agitação magnética (200 rpm) e continuamente recirculados através do leito fixo, contendo 12 g de SFBC (base seca), a uma vazão de 5 mL min^{-1} , conforme descrito em 4.6 (Figura 12). Para tempos de reação definidos (entre 0 e 48h) foram determinadas a conversão, a concentração dos componentes da mistura reacional global e de cada fase (aquosa e orgânica), bem como a sorção da mistura reacional em SFBC. Para estas análises, foi necessária uma nova reação com SFBC e meio reacional novo para cada tempo estudado, conforme descrito em 4.6.

5.6.1 Efeito da razão molar na conversão de equilíbrio

A velocidade inicial da reação diminuiu com o aumento da razão molar (etanol:AGL) de 1:1 para 3:1 no reator de leito fixo (Figura 25), da mesma forma que nos frascos agitados (Figura 24). No entanto, o aumento da razão molar de 1:1 para 1,5:1 não diminuiu a velocidade inicial da reação, indicando que não ocorreu inibição pelo etanol. Além disso, nesta reação foi obtida uma maior conversão (90%) no equilíbrio quando comparado com a conversão (80%) obtida na reação com razão molar estequiométrica (1:1).

O equilíbrio da reação foi considerado quando não houve mais incremento na conversão. Para as reações com razão molar 1:1 e 1,5:1 o equilíbrio foi atingido em 24 e 36 h respectivamente, enquanto que na reação com razão molar 3:1 foram obtidos 77% de conversão em 24 h e 85% em 48 h, indicando que não foi alcançado o equilíbrio durante o tempo de reação avaliado.

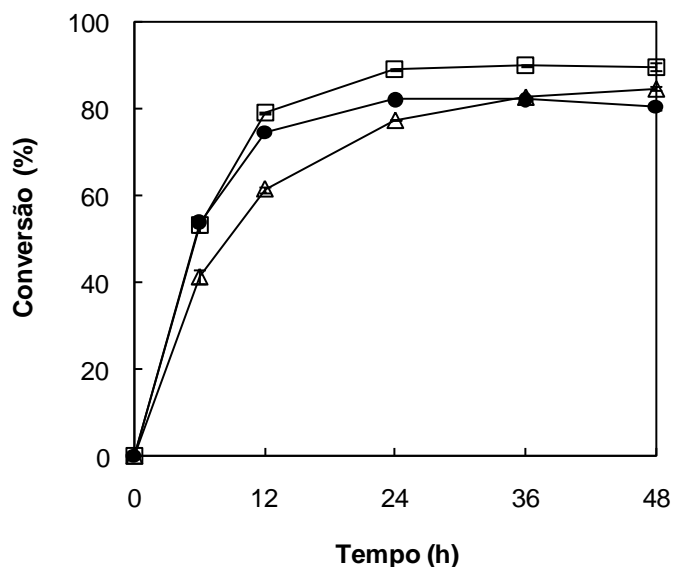


FIGURA 25 - EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO

Razão molar (etanol:AGL) de (●) 1:1, (□) 1,5:1 e (Δ) 3:1. Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 18, 25 e 50 g de etanol, equivalentes a razão molar (etanol:AGL) 1:1, 1,5:1 e 3:1, respectivamente; 45°C e vazão de recirculação 5 mL min⁻¹. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Os valores de conversão obtidos experimentalmente foram comparados com os valores da conversão de equilíbrio (Tabela 15), calculados por modelo termodinâmico (Anexo A). Para a reação com razão molar 3:1, a conversão de equilíbrio calculada (88%) foi maior do que a conversão obtida experimentalmente (85%). Este fato sustenta o pressuposto de que o tempo avaliado de reação (48 h) não foi suficiente para atingir o equilíbrio. Provavelmente, se a reação fosse continuada até ser atingido o equilíbrio, a conversão para a razão molar 3:1 seria maior do que as conversões obtidas nas razões molares 1:1 e 1,5:1. No entanto, o aumento do tempo de reação diminuiria a produtividade. Desta forma, optou-se por padronizar neste estudo o tempo máximo de reação de 48 h.

TABELA 15 - DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS DE CONVERSÕES DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

| Razão molar (etanol:AGL) | Conversão de equilíbrio experimental | Conversão de equilíbrio estimada por modelo termodinâmico |
|-----------------------------|---|--|
| 1:1 | 80% | 73% |
| 1,5:1 | 90% | 80% |
| 3:1 | * 85% | 88% |

* Para a razão molar 3:1 não foi alcançado o equilíbrio durante o tempo de reação avaliado, assim o valor anotado corresponde à máxima conversão obtida em 48 h.

Para as reações feitas nas razões molares 1:1 e 1,5:1, a conversão de equilíbrio experimental foi maior quando comparada com a conversão de equilíbrio calculada por modelo termodinâmico (Tabela 15). O cálculo da conversão de equilíbrio foi feito baseado nas propriedades termodinâmicas do ácido oleico puro por inexistirem dados termodinâmicos de misturas de AGLs. Assim, a conversão de equilíbrio termodinâmico para a mistura de AGLs do óleo ácido da borra de soja poderia ser maior quando comparada à conversão considerando o ácido oleico puro. Para verificar esta hipótese, foi feita uma nova reação no reator em leito fixo nas mesmas condições utilizadas na razão molar 1,5:1, mas com ácido oleico como substrato. Nesta reação, foram obtidos 90% de conversão no equilíbrio (dados não mostrados), sendo igual à conversão de quando foi utilizada a mistura de AGLs do óleo ácido da borra de soja como substrato. Deste modo, a composição dos substratos utilizados não influenciou na conversão de equilíbrio experimental.

5.6.2 Determinação dos componentes na mistura reacional global e nas fases orgânica e aquosa

O sistema reacional foi composto inicialmente por uma fase homogênea formada por etanol e AGLs para todas as razões molares e condições estudadas. Durante a reação, o aumento da produção de água e de éster levou à formação de um sistema heterogêneo (bifásico), composto por uma fase orgânica e outra aquosa.

Visualmente, é impossível saber qual o tempo inicial exato em que um sistema reacional torna-se bifásico, é possível observar apenas uma turbidez na mistura reacional. Com a finalidade de investigar mais profundamente a reação estudada, a fração molar dos componentes (etanol, AGLs, éster e água) na mistura reacional global (Figura 26-1) e em cada fase (aquosa e orgânica) foi determinada durante a reação (Figura 26-2), conforme descrito em 4.6.

Na análise da fração molar global da reação de razão molar estequiométrica (1:1) (Figura 26-A1) observou-se que a diminuição da fração molar de etanol não foi proporcional à diminuição da fração de AGL, assim como o aumento da fração molar de éster não foi proporcional ao aumento da fração de água. Os coeficientes estequiométricos desta reação são iguais, deste modo a fração molar dos reagentes deveria ser igual, assim como a fração molar dos produtos. Este resultado mostra claramente que uma parte dos componentes foi sorvida por SFBC alterando a concentração destes na mistura reacional, conforme demonstrado posteriormente (5.6.3, Figura 27).

A fase aquosa foi avaliada apenas quando foi possível separar pelo menos 500 µL de amostra desta fase, que foi a quantidade mínima necessária para as análises, conforme descrito em 4.6.1. Como o intervalo de tempo para a coleta de amostras foi mantido fixo, o primeiro ponto analisado da fase aquosa (linha descontínua, Figura 26-2) representa o tempo onde foi possível separar quantidade suficiente desta fase. Assim, para as razões molares 1:1, 1,5:1 e 3:1, as alíquotas foram analisadas a partir de 6, 12 e 24 h, respectivamente (Figura 26-2). Com o aumento da razão molar, o sistema monofásico foi mantido por mais tempo devido ao aumento da miscibilidade entre os componentes.

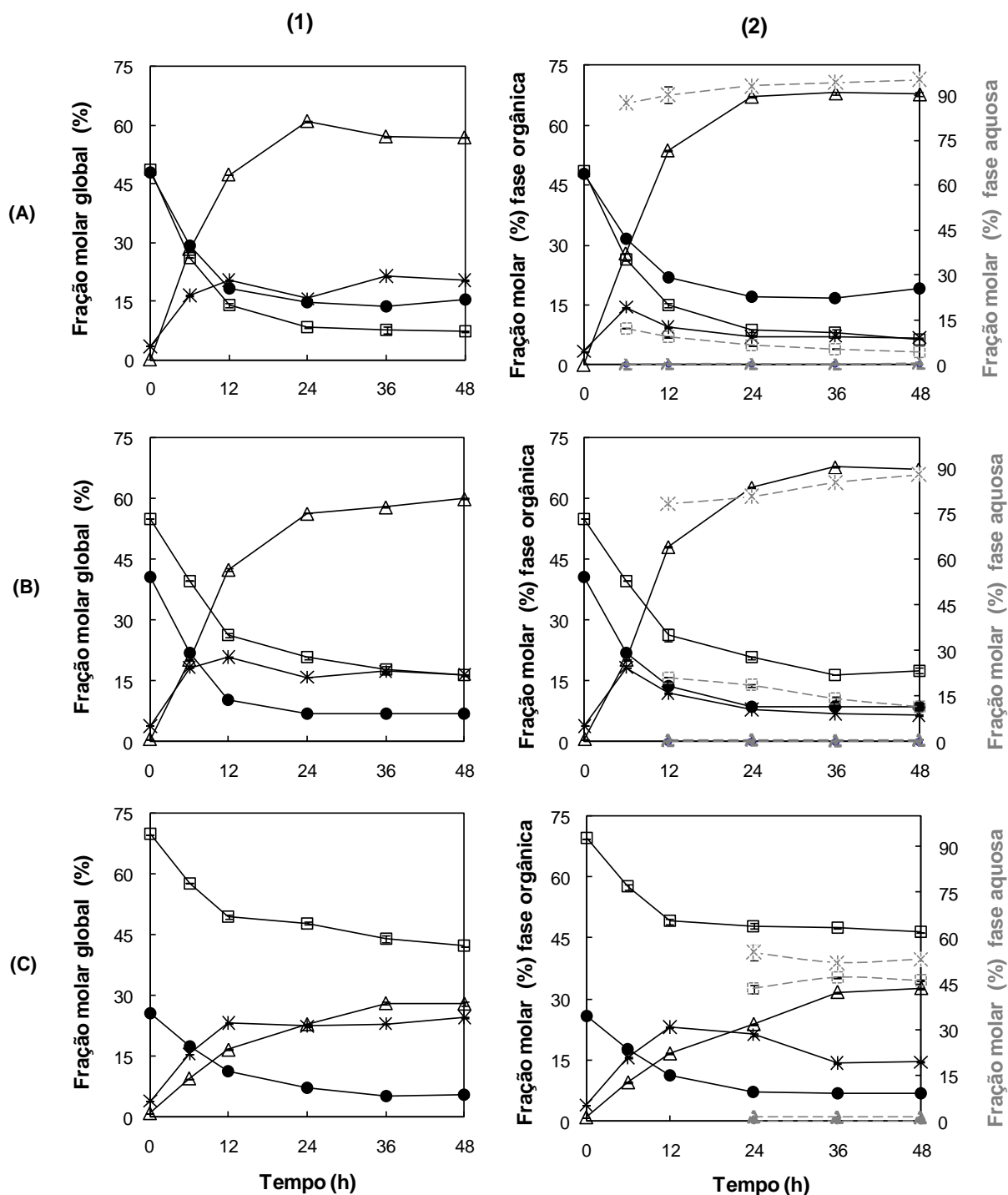


FIGURA 26 - FRAÇÃO MOLAR DOS COMPONENTES NA MISTURA GLOBAL E NAS FASES ORGÂNICA E AQUOSA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM REATOR DE LEITO FIXO

Razão molar (etanol:AGL): **(A)** 1:1, **(B)** 1,5:1 e **(C)** 3:1. Coluna **(1)**: fração molar dos componentes na mistura global. Coluna **(2)**: fração molar dos componentes nas fases orgânica (linha contínua) e aquosa (linha descontinua). Legenda: (●) AGLs; (□) etanol; (Δ) etil-ésteres; (*) água. Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 18, 25 e 50 g de etanol, equivalentes a razão molar (etanol:AGL) 1:1, 1,5:1 e 3:1, respectivamente; 45°C e vazão de recirculação 5 mL min⁻¹.

Observou-se na fase orgânica uma diminuição da fração molar dos substratos (AGLs e etanol) e um aumento da fração molar de ésteres durante a reação (linha contínua, Figura 26-2). A fração molar da água nesta fase aumentou quando o sistema era monofásico e diminuiu quando o sistema ficou bifásico, devido à partição da água entre as fases. Na fase aquosa, a fração molar da água foi então aumentando conforme o tempo da reação (linha descontínua, Figura 26-2). Este mesmo comportamento foi observado em um estudo da reação de esterificação do ácido oleico e etanol (razão molar estequiométrica) catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B a 45°C, onde a composição das fases foi determinada apenas por simulação matemática do equilíbrio de fases do sistema (FORESTI et al., 2007).

Para a fase aquosa, observou-se que a fração molar de AGLs e de ésteres foi insignificante quando comparada à fração molar destes componentes na fase orgânica (Figura 26-2). A fração molar do etanol diminuiu nas duas fases ao longo das reações de razão molar 1:1 e 1,5:1, sendo uma parte consumida na reação e outra sorvida por SFBC.

5.6.3 Sorção dos componentes da mistura reacional no sólido fermentado

A quantidade de mistura reacional sorvida por SFBC durante a reação foi determinada por diferença de peso em relação à quantidade de SFBC adicionada no início da reação, conforme descrito em 4.6. Observou-se uma sorção de 20 a 25 g da mistura reacional nas primeiras horas de reação (6 h), que aumentou relativamente pouco ao longo da reação, chegando a 30 g em 48 h (linha descontínua, Figura 27). Comparando a quantidade de mistura reacional sorvida por SFBC (linha descontínua) com os valores de conversão (linha contínua), foi observado que uma maior quantidade da mistura (em g) foi sorvida com o aumento da conversão. Por exemplo, a quantidade de mistura reacional sorvida durante a reação de razão molar 1,5:1 foi maior quando comparada com as outras reações, onde as conversões foram menores. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento da produção de água e do consumo do etanol, que conseqüentemente contribuiu para o aumento da densidade global da mistura.

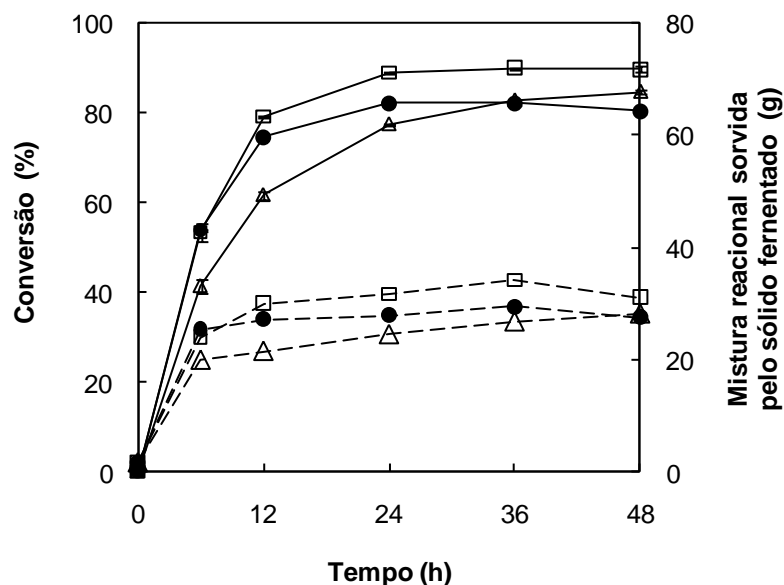


FIGURA 27 - SORÇÃO DA MISTURA REACIONAL NO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO

Razão molar de etanol:AGL: (●) 1:1, (□) 1,5:1 e (△) 3:1. Linha contínua: conversão dos substratos em etil-ésteres; linha descontinua: sorção da mistura reacional pelo sólido fermentado. Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 18, 25 e 50 g de etanol, equivalentes a razão molar (etanol:AGL) 1:1, 1,5:1 e 3:1, respectivamente, a 45°C e vazão de recirculação 5 mL min⁻¹.

Durante as reações, foi feito também um balanço de massa da soma total da mistura reacional mais SFBC no início da reação e em cada tempo avaliado. De maneira geral, foi verificada uma perda de 4 a 6% para cada tempo de reação avaliado, decorrentes de resquícios da mistura retida nas tubulações, coluna e vaso reacional. Não foi possível quantificar experimentalmente os componentes sorvidos individualmente por SFBC, mas foi possível determinar o teor de água e etanol sorvidos em percentual (m/m) (linha contínua, Figura 28), em balança de infravermelho (4.7.1). A partir destes resultados, foi calculado o teor de AGLs e éster sorvido (linha descontinua, Figura 29), conforme descrito em 4.6. O aumento da razão molar dos substratos causou um aumento na sorção dos componentes hidrofílicos (etanol e água), e consequentemente uma diminuição na sorção dos componentes hidrofóbicos (AGL e éster) em SFBC (Figura 28).

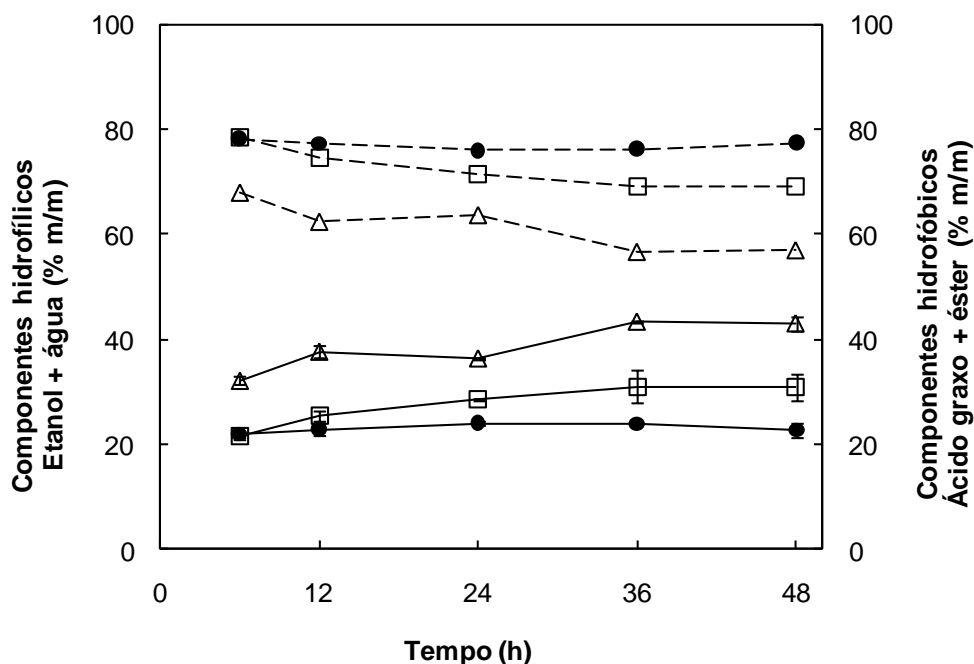


FIGURA 28 - SORÇÃO DOS COMPONENTES HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS NO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO

Razão molar de etanol:AGL: (●) 1:1, (□) 1,5:1 e (Δ) 3:1. Linha contínua: sorção dos componentes hidrofílicos (etanol e água); linha descontinua: sorção dos componentes hidrofóbicos (AGL e éster). Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca); meio reacional: 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 18, 25 e 50 g de etanol, equivalentes a razão molar (etanol:AGL) 1:1, 1,5:1 e 3:1, respectivamente, a 45°C e vazão de recirculação 5 mL min⁻¹. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Como relatado, estes resultados foram expressos em percentual mássico porque não foi possível quantificar de forma direta os componentes individualmente. No entanto, a partir da determinação dos componentes individuais na mistura reacional (Figura 26-1), foi possível fazer uma estimativa da quantidade dos componentes sorvidos por SFBC. Para isso, a quantidade (em mol) de cada componente sorvido por SFBC foi estimada a partir da diferença entre a quantidade de mols do componente calculada por estequiometria e a quantidade de mols na mistura reacional determinada experimentalmente (Figura 26-1).

A Figura 29 mostra a quantidade em mmol de cada componente estimada para cada razão molar, em 48 h de reação. Observou-se que a quantidade de mols dos componentes hidrofílicos (etanol e água) sorvidos por SFBC foi notavelmente maior quando comparada com a quantidade sorvida dos componentes hidrofóbicos (AGL e éster). Em relação à quantidade de substratos sorvidos por SFBC, observou-

se um aumento da razão etanol/AGL (mol/mol) sorvida com o aumento da razão molar utilizada. Por exemplo, para as razões molares 1:1, 1,5:1 e 3:1 foram sorvidos 42, 134 e 381 mmol de etanol e 19, 6 e 3 mmol de AGL (Figura 29), correspondente a razão etanol/AGL sorvida de 2, 22 e 127, respectivamente. Desta forma, o número de chances das moléculas de AGL atingir o sítio ativo é reduzido devido à grande quantidade de mols de etanol próximos da lipase, diminuindo a velocidade da reação, conforme pressuposto em 5.5.5 (Figura 24).

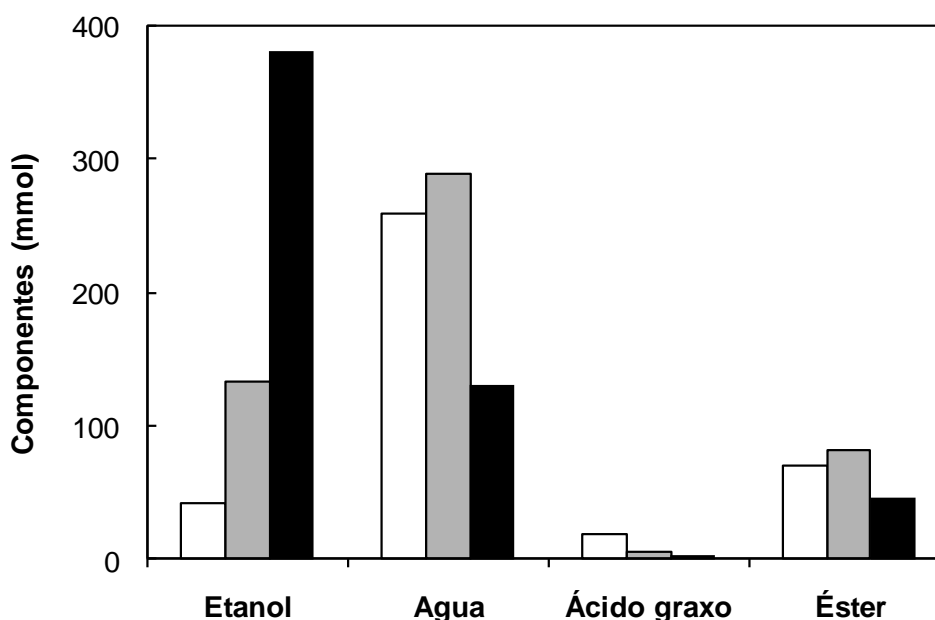


FIGURA 29 - SORÇÃO ESTIMADA DOS COMPONENTES DA MISTURA REACIONAL NO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 DURANTE A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO

Razão molar etanol:AGL: (barra em cor branca) 1:1, (barra em cor cinza) 1,5:1 e (barra em cor preta) 3:1. Os valores plotados correspondem à diferença entre a quantidade do componente calculada por estequiometria e determinada experimentalmente na mistura reacional global, em 48 h de reação.

Alguns autores sugerem que a atividade da lipase em função da composição da interface (“qualidade da interface”) é mais atribuída à inacessibilidade ao substrato do que pela desnaturação ou inativação da enzima (PENG et al., 2013; REIS et al., 2009; MATEO et al., 2007). Na interface são encontrados basicamente a lipase, o suporte, os substratos e os produtos, que interagem entre si. No entanto, o

conhecimento sobre o efeito da composição da interface na catálise enzimática é ainda limitado.

A lipase de *B. cepacia* LTEB11 é extracelular e fica imobilizada no sólido por adsorção, por interação hidrofóbica ou hidrofílica e também pode ficar na parede celular, que é hidrofóbica. A complexidade da composição de SFBC dificulta sua avaliação, mas os resultados apresentados na Figura 29 indicam que SFBC sorveu componentes hidrofílicos e hidrofóbicos.

5.6.4 Alteração do estado de equilíbrio da reação

Visto que foi obtido uma maior conversão na reação de razão molar 1,5:1, optou-se em continuar os estudos de esterificação no reator de leito fixo com esta razão molar. Conforme relatado em 5.6.1 a 5.6.3, os estudos de equilíbrio das reações de esterificação em diferentes razões molares foram feitos com a mistura reacional mantida no reservatório sob agitação magnética (200 rpm), e a separação das fases foi feita por centrifugação, conforme descrito em 4.6 (Figura 12).

Para verificar o efeito da separação natural das fases na conversão de equilíbrio da reação, a reação de razão molar selecionada (1,5:1) foi repetida sem agitação do meio reacional contido no reservatório. A separação das fases foi observada próximo de 6 h de reação, através da visualização de gotículas imiscíveis com a fase orgânica, que decantaram para o fundo do reservatório formando a fase aquosa (Figura 30). A partir deste ponto, apenas a fase orgânica (superior) foi recirculada no reator de leito fixo. Para isto, a captação da mistura reacional foi feita acima da interface (orgânica/aquosa) e o retorno da mistura foi feito na fase aquosa, no fundo do reservatório (Figura 30). Mesmo com a recirculação constante da mistura reacional, a interface permaneceu evidente, devido à baixa vazão de recirculação aplicada (5 mL min^{-1}).

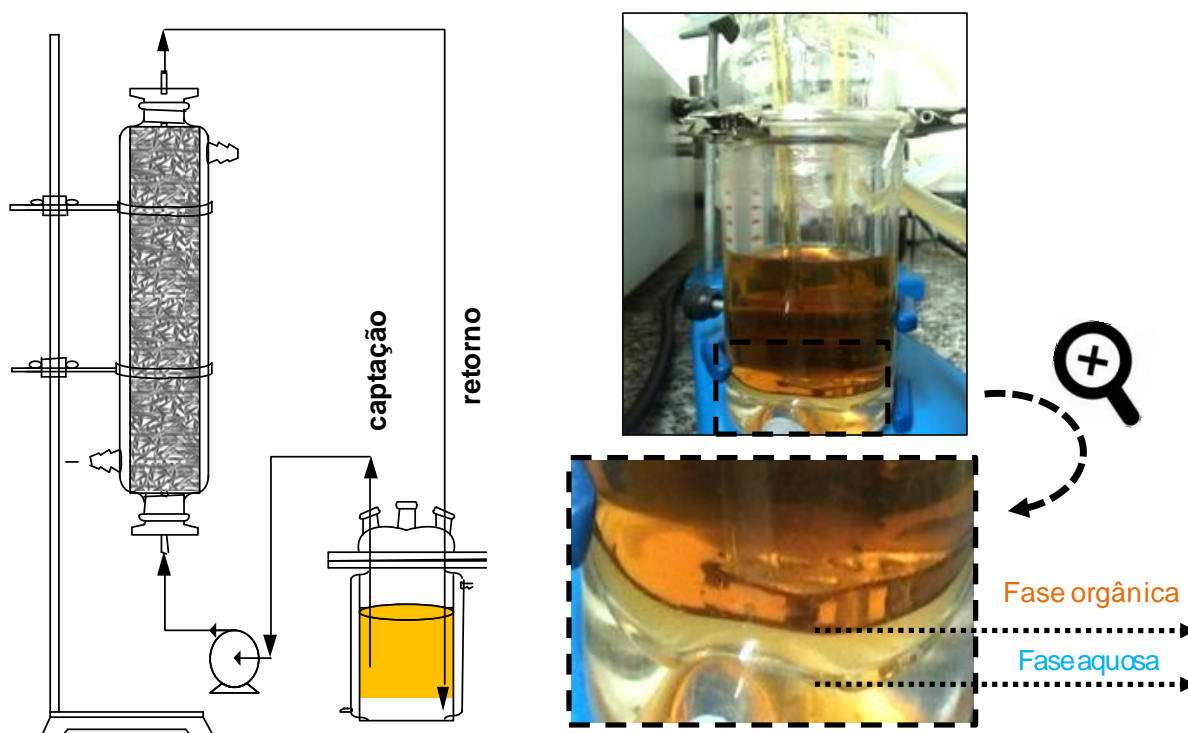


FIGURA 30 - SEPARAÇÃO DAS FASES DA MISTURA REACIONAL NO EQUILÍBRIO

Condições: reservatório contendo a mistura reacional sem agitação magnética, vazão de recirculação através da coluna de 5 mL min^{-1} , a 45°C .

Inicialmente, as velocidades iniciais das reações com e sem agitação magnética da mistura contida no vaso reacional foram iguais (dados não mostrados). No entanto, a conversão no equilíbrio aumentou de 90 para 92% quando a mistura reacional não foi agitada. No equilíbrio, a quantidade de componentes hidrofílicos (etanol e água) sorvidos por SFBC na reação em que a mistura reacional foi agitada foi de 31% (m/m) enquanto que para a reação sem agitação foi de apenas 10%. Esta diminuição da sorção dos componentes hidrofílicos foi consistente com a diminuição da concentração de etanol e água na fase orgânica, que foi particionada para a fase aquosa, contribuindo assim para o aumento da conversão de equilíbrio da reação.

Com o objetivo de verificar o efeito da sorção de compostos hidrofílicos na conversão de equilíbrio, foram feitas reações adicionando-se diferentes quantidades de água (10 e 20%, em relação à massa da mistura reacional) no início da reação, mantendo-se a mistura reacional sem agitação magnética. A adição destes

percentuais de água tornou o sistema bifásico desde o início da reação. Além do efeito da adição de água, foi verificado também o efeito da retirada de água através da adição de peneira molecular (3\AA), e o efeito da umidade inicial de SFBC. Para isto, foi utilizado em uma das reações SFBC com 5% de umidade inicial, enquanto que para todas as outras reações foi utilizado um lote de SFBC contendo 10% de umidade inicial. Como controle, foram utilizados os resultados da reação com SFBC com 10% de umidade sem adição de água (Figura 31).

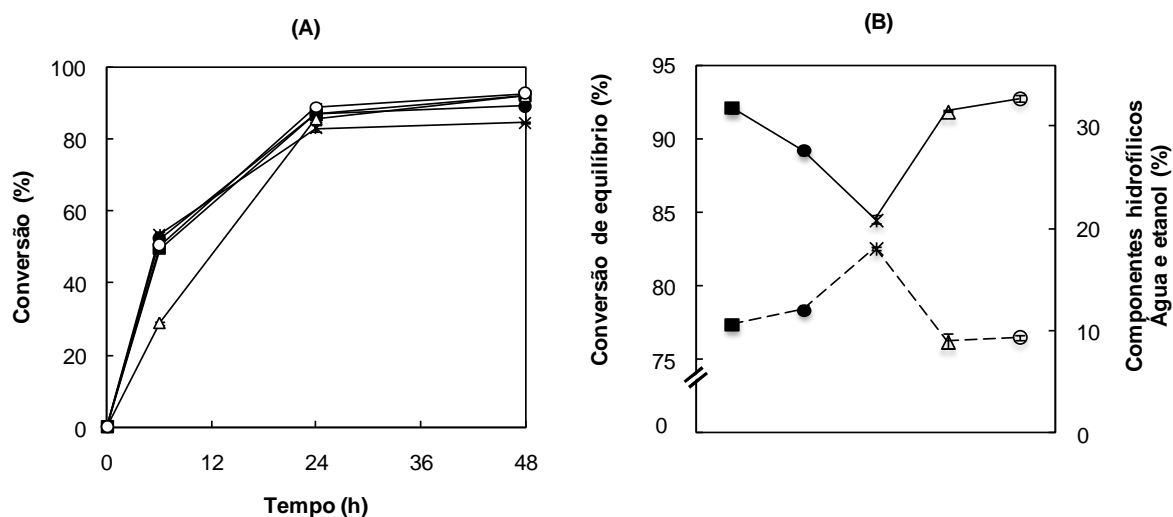


FIGURA 31 - EFEITO DA SORÇÃO DOS COMPONENTES HIDROFÍLICOS NO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 NA CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO

(A) Conversão; (B) Linha contínua - conversão no equilíbrio; linha descontínua - sorção dos componentes hidrofílicos no sólido fermentado. Legenda: (■) controle; (●) adição de 10% e (*) 20% de água (em relação à massa total de mistura reacional); (Δ) reação com sólido fermentado com 5% de umidade; (○) adição de peneira molecular 3\AA . Condições: 12 g de sólido fermentado (base seca), 100 g de AGLs do óleo ácido da borra de soja, 25 g de etanol, razão molar (etanol:AGL) 1,5:1, a 45°C e vazão de recirculação 5 mL min^{-1} . Os valores plotados são as médias das análises em duplicata \pm o erro padrão da média.

Para a reação feita com SFBC com 5% de umidade inicial foram obtidos 29% de conversão em 6 h de reação, enquanto que para as outras reações, onde foi utilizado SFBC com 10% de umidade, foram obtidas conversões de 50 a 53% para o mesmo tempo de reação (Figura 31-A). A diminuição da umidade de SFBC para 5% provocou uma diminuição na velocidade inicial da reação, provavelmente devido à

diminuição da atividade catalítica da lipase causada pela retirada da água. No entanto, em 48 h de reação foi obtida a mesma conversão da reação controle (92%), feita com SFBC com 10% de umidade (Figura 31-B). A utilização de um sólido fermentado mais úmido é vantajosa em relação ao custo da secagem. Não foram testados sólidos fermentados com umidades maiores do que 10%, devido à possibilidade de contaminação durante o armazenamento. Além disso, umidades maiores do que 10% aumentariam a quantidade de componentes sorvidos em SFBC, diminuindo a conversão no equilíbrio.

Para as reações feitas sem adição de água foram obtidas conversões de 92 a 93%, enquanto que para as reações com adição de 10 e 20% de água foram obtidas conversões de 89 e 85%, respectivamente (linha contínua, Figura 31-B). A água adicionada no início da reação somada com a água produzida na reação influenciou no equilíbrio, aumentando a quantidade de componentes hidrofílicos sorvidos em SFBC (linha descontínua, Figura 31-B). Por exemplo, para a reação controle, foram sorvidos por SFBC 10% de componentes hidrofílicos e para as reações com adição de 10 e 20% de água foram sorvidos 12 e 18%, respectivamente (Figura 31-B). A adição de peneira molecular não influenciou significativamente na conversão e na sorção dos componentes hidrofílicos em SFBC, quando comparada com o controle. No entanto, observou-se que toda a fase aquosa presente no vaso reacional foi adsorvida pela peneira molecular. Provavelmente, a adição de uma quantidade maior de peneira molecular promoveria a redução da quantidade de água sorvida em SFBC, mas poderia também retirar a quantidade mínima de água para a manutenção da atividade da lipase.

Em reações enzimáticas, uma quantidade mínima de água é necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa da enzima. Entretanto, em reações de síntese, a presença de água desloca o equilíbrio a favor da hidrólise. A quantidade de água essencial depende basicamente da enzima, das características do suporte, da polaridade do meio reacional e dos substratos (FORESTI et al., 2007; SANDOVAL et al., 2002, KLIBANOV, 2001).

De maneira geral, a diminuição do percentual dos componentes hidrofílicos sorvidos em SFBC favoreceu a produção de ésteres. No entanto, a adição de água promoveu um efeito contrário. Estudos da literatura mostram que a adição de pequenas quantidades de água no início de reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases pode contribuir para o aumento da

atividade da enzima (LIU et al., 2012; SALUM et al., 2010; CHEN; LIN, 2010; FORESTI et al., 2007). Por outro lado, em reações de esterificação, a quantidade de água adicionada no início da reação somada com a água produzida durante a reação diminui a conversão de equilíbrio. Por exemplo, na reação de síntese de oleato de etila catalisada pela lipase Novozyme 435®, a 45°C, Foresti et al. (2007) obtiveram conversões de equilíbrio de 87, 82, 82 e 80% para reações com adição de água de 0, 5, 10 e 20% (em relação à massa de meio reacional), respectivamente.

A aplicação direta de sólidos fermentados na síntese de ésteres ainda é pouco estudada, e não foram encontrados na literatura estudos aprofundados sobre as características deste biocatalisador. A maioria dos estudos de esterificação enzimática encontrados na literatura foram realizados com lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos (ADACHI et al., 2013; WATANABE et al., 2007; FORESTI et al., 2007; BUCALÁ et al., 2006). Dentre os estudos que utilizaram suportes hidrofílicos (FORESTI et al., 2008; SANDOVAL et al., 2002), apenas Sandoval et al. (2002) mencionaram o efeito da adsorção de água no suporte. Os autores verificaram neste estudo que o aumento da quantidade de catalisador aumentou a conversão de equilíbrio, devido à adsorção da água no suporte da enzima. Eles afirmaram que a utilização de suportes hidrofílicos em reações de esterificação tem um efeito positivo por diminuir o teor de água no meio reacional, contribuindo para o deslocamento do equilíbrio em direção à formação dos produtos.

Analisando os resultados do estudo da alteração do equilíbrio da reação catalisada por SFBC, verificou-se que diversos fatores estão influenciando na conversão do equilíbrio, tais como, umidade inicial de SFBC, agitação do sistema reacional, e sorção dos componentes hidrofílicos; portanto, o conhecimento destes fatores torna-se importante para futuros experimentos. Supõe-se que as diferenças entre conversões relatadas na literatura envolvendo reações em condições similares sejam fortemente influenciadas por estes fatores.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um processo de esterificação etílica por catálise enzimática em reator de leito fixo preenchido com sólido fermentado seco contendo lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e misturas de ácidos graxos livres obtidas por hidrólise em água subcrítica.

Um novo método de secagem, por fluxo de ar seco em coluna, foi desenvolvido e utilizado com sucesso para a secagem do sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11. Este método de secagem não necessita da etapa de congelamento do sólido fermentado e é menos dispendioso que o processo de liofilização, habitualmente utilizado. Além disso, a atividade lipolítica do sólido fermentado seco foi mantida após este processo e após armazenamento por um longo período em temperatura ambiente.

Foram utilizadas como substrato misturas de ácidos graxos livres obtidas por hidrólise de matérias graxas de baixo custo em água subcrítica, como o óleo ácido da borra de soja, sebo de graxaria e óleo de gordura residual. O óleo ácido da borra de soja foi selecionado para o estudo em reator de leito fixo em sistema livre de co-solvente, onde foram obtidos 92% de conversão em 31 h. A conversão obtida no primeiro ciclo foi mantida por 4 ciclos, diminuindo para 64% após 8 ciclos, equivalentes a 384 h de uso. Comparado ao processo de transesterificação, catalisado pelo sólido fermentado de *B. cepacia* LTEB11, o processo de esterificação proposto neste trabalho possibilitou um aumento do número de reutilizações do sólido fermentado e também um aumento da produtividade em éster.

Nos estudos de equilíbrio termodinâmico da reação de esterificação verificou-se que a sorção dos componentes da reação influenciou na conversão de equilíbrio, que diminuiu com o aumento da sorção dos componentes hidrofílicos no sólido fermentado. A maior conversão em éster foi obtida com razão molar 1,5:1 e foi maior do que a calculada por modelo termodinâmico (80%). A conversão aumentou quando o sistema reacional foi mantido sem agitação, com recirculação apenas da fase orgânica através do leito fixo, devido à separação da água e diminuição da sorção dos componentes hidrofílicos.

As melhores condições estabelecidas neste estudo para síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo foram: adição de 12% de sólido fermentado (em relação à massa de ácidos graxos livres) com umidade inicial de 10% (em base seca); razão molar dos substratos (etanol:ácidos graxos livres) 1,5:1, sistema reacional mantido no vaso reacional sem agitação, com recirculação apenas da fase orgânica a uma vazão de 5 mL min^{-1} , a 45°C .

Neste trabalho, o processo de hidroesterificação, utilizando uma etapa de hidrólise em água subcrítica seguida da esterificação catalisada por sólidos fermentados, foi proposto pela primeira vez e possibilitou o uso de matérias-primas residuais sem necessidade de pré-tratamento, e a aplicação direta do sólido fermentado dispensou etapas adicionais de recuperação e imobilização da lipase.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e abrem novas perspectivas para os seguintes trabalhos futuros:

- Ampliação da escala de produção de ésteres etílicos em reatores de leito fixo através da introdução de reatores conectados em série e vasos reacionais com um sistema de extração da fase aquosa;
- Produção contínua de ésteres etílicos;
- Desenvolvimento de uma metodologia de recuperação dos produtos finais incluindo: reaproveitamento do sólido fermentado usado em uma nova FES, potencial de utilização do sólido fermentado usado como material comburente em caldeiras, purificação do biodiesel, recuperação e reciclo do etanol;
- Estudo da viabilidade econômica do processo, incluindo custos da FES, matéria-prima, hidrólise em água subcrítica, esterificação em reator de leito fixo, purificação do biodiesel, recuperação e reciclo do etanol.

8 REFERÊNCIAS

- ABOISSA OLEOS VEGETAIS. Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br>>. Acesso em 10/08/2013.
- ADACHI, D.; HAMA, S.; NAKASHIMA, K.; BOGAKI, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410-416, 2013.
- ADLERCREUTZ, P. **Biocatalysis in non-conventional media**. In: Applied Biocatalysis. Netherlands: Ed. Harwood academic publishers, 2000.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 28-35, 2010.
- AL-ZUHAIR, S.; LIG, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p.951-960, 2007.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ca 5a-40), 4 ed, Champaign, 1989.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Cd 3-25), 4 ed, Champaign, 1990.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Cd 1-25), 4 ed, Champaign, 1995.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ce 1-62), 4 ed, Champaign, 1997.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ca 2e-84), 4 ed, Champaign, 1997.
- ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 10/07/2013.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg. AOAC International, 2005.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BANKOVIC-ILIC, I. B.; STARNENKOVIC, O. S.; VELJKOVIC, V. B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3621-3647, 2012.

BARON, A. M.; ZAGO E.C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 19-24, 2011.

BARON, A. M.; BAROUTH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **FUEL**, v. 117 (part A), p. 458-462, 2014.

BIZ, A. **Produção de pectinases por fermentação no estado sólido para a obtenção de ácido D-Galacturônico em biorrefinarias**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BORGES, M. E.; DIAZ, L.; Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2839-2849, 2012.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BOTTON, V.; TODO BOM, M. A.; CARMO, L. C. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Síntese de ésteres etílicos utilizando a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. In: XIX SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, X SIMPOSIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS, 2013, Foz do Iguaçu-PR.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 26 de dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 23 de set. 2005.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 142, nº 10, p. 52, 14 jan. 2005.

BRASIL. Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BUCALÁ, V.; FORESTI, M. L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M. L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 914-920, 2006.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT' ANNA, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-8, 2010.

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p.11-20, 2012.

CHEN, H. C.; JU, H. Y.; WU, T. T.; LIU, Y. C.; LEE, C. C.; CHANG, C.; CHUNG, Y. L.; SHIEH, C. J. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

CHEN, J. P.; LIN, G. H.; Optimization of biodiesel production catalyzed by fungus cells immobilized in fibrous supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 181-194, 2010.

CHEN, Y. M.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. M.; WANG, X. W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 668-673, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. Nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of System and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1481-1490, 2001.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

DA ROS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

DE SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 133-137, 2010.

DHAYMERS Especialidades. Disponível em: <<http://www.dhaymers.com.br>>. Acesso em 10/08/2013.

DIAS, J. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C.; ALMEIDA, M. F.; Production of biodiesel from acid waste lard. **Bioresource Technology**, v. 24, p. 6355-6361, 2009.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 194-200, 1999.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 117-124, 2002.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação - uma avaliação econômica**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

EUROPEAN STANDARD (EN). Fat and oil derivatives, fatty acid methyl esters, determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (EN 14103), CEN, European Committee for Standardization, 2003.

EUROPEAN STANDARD (EN). Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications - Requirements and test methods (EN 14214), CEN, European Committee for Standardization, 2003.

FAO (*Food and Agricultural Organization of United Nations*). Disponível em: <faostat.fao.org>. Acesso em 10/08/2013.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERRARI, J. C.; NAGATANI, G.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. Application of stochastic algorithms for parameter estimation in the liquid-liquid phase equilibrium modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 280, p. 110-119, 2009.

FOGLER, H. S. (2002). **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 3a ed. Rio de Janeiro, RJ. Livros Técnicos e Científicos (LTC), 1999.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1408-1425, 2005.

FORESTI, M. L.; PERDENERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FORESTI, M. L.; PERDENERA, M.; FERREIRA, M. L.; BUCALÁ, V. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v. 334, p. 65-72, 2008.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

GRAESER, V. **Esterificação não-catalítica de ácido láurico com etanol anidro: cinética e conversão de equilíbrio**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAAS, M. J.; BLOOMER, S.; SCOTT, K. Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 373-379, 2000.

HAAS, M. J.; MICHALSKI, S.; RUNYON, S.; NUNEZ, A.; SCOTT, K. M. Production of FAME from acid oil, a by-product of vegetable oil refining. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 80, p. 97-102, 2003.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1087-1096, 2005.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 188-194, 2009.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 710-716, 2009.

HALLING, P.J. High affinity bindings of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1040, p. 225-228, 1990.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 66-71, 2011a.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10419-10424, 2011b.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLLIDAY, R. L.; KING, J. W.; LIST, G. R. Hydrolysis of vegetable oils in sub- and supercritical water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 932-935, 1997.

HUANG, D.; HAN, S.; HAN, Z.; LIN, Y. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isooctane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 10-14, 2012.

HUNAN RIVERS BIOENGINEERING. Disponível em: <<http://www.warivers.com>>. Acesso em 10/09/2013.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis principles and application**. Springer Netherlands, p. 205-251, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VANHEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JENSEN, R. G.; GALLUZZO, D. R.; BUSH, V. J. Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 3, p. 307-316, 1990.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, p. 173-185, 1997.

KING, J. W.; HOLLIDAY, R. L.; LIST, G. R. Hydrolysis of soybean oil in subcritical water flow reactor. **Green Chemistry**, v. 1, p. 261-264, 1999.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p. 241-246, 2001.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; DE LIMA, V. M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Biosurfactants**, v. 672, p. 203-210, 2010.

KRISHNA, S. H.; KARANTH, N. G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**, v. 44, p. 499-591, 2002.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

LAUDANI, C. G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 74-81, 2007.

LEBEDEVAS, S.; VAICEKAUSKAS, A.; LEBEDEVA, G.; MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P.; KAZANCEV, K. Use of waste fats of animal and vegetable origin for the production of biodiesel fuel: Quality, motor properties, and emissions of harmful components. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 2274-2280, 2006.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIU, C. H.; HUANG, C. C.; WANG, Y. W.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012.

LIU, T.; LIU, Y.; WANG, X.; LI, Q.; WANG, J.; YAN, Y. Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 71, p. 45-50, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, X. A.; TAN, H.; YAN, Y. J.; HAMEED, B. H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1176-1180, 2010.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303-309, 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and Kinetics. **Applied Energy**, v. 113, p. 713-721, 2014.

LOTERO, E.; LIU, Y. J.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353-5363, 2005.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MAGNUSSEN, T.; RASMUSSEN, P.; FREDENSLUND, A. UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibriums. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 20, p. 331-339, 1981.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MARTINEZ-RUIZ, A.; GARCIA, H. S.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 393-401, 2008.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATH, M. C.; KUMAR, S. P.; CHETTY, S. V. Technologies for biodiesel production from used cooking oil – A review. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 339-345, 2010.

MITCHELL, D. A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 167-178, 1999.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation ii. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v.35, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor step of SSF: A complex interaction of phenomena**. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Springer, p. 13-32, Heidelberg, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998.

MOURE, V. R.; FABRÍCIO, C.; FRENCH, G.; MARQUES, F. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013 (*in press*).

NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKACS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

PAIVA, E. J. M.; GRAESER, V.; WYPYCH, F.; CORAZZA, M. L. Kinetics of non-catalytic and ZnL2-catalyzed esterification of lauric acid with ethanol. **Fuel**, 2013 (*in press*).

- PAN, S. T.; LIU, X.; XIE, Y. D.; YI, Y. Y.; LI, C.; YAN, Y. J.; LIU, Y. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9822-9824, 2010.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PARK, J.; KIM, D.; WANG, Z.; LEE, J.; PARK, S.; LEE, J. Production of biodiesel from soapstock using an ion-exchange resin catalyst. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 1350-1354, 2008.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Properties of free and immobilised lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 276-280, 1999.
- PENG, Y.; ZHU-PING, H.; YONG-JUAN, X.; PENG-CHENG, H.; JI-JUN, T. Effect of support surface chemistry on lipase adsorption and activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 69-75, 2013.
- PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Chemical engineers' handbook**. Tokyo: McGraw-Hill, 5ed., 1973.
- POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.
- QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, p. 41-46, 2008.
- RASERA, K. **Utilização de sólido fermentado obtido a partir de fungos do gênero *Rhizopus* como catalisador para modificação de óleos e gorduras**. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- RASERA, K.; OSÓRIO, N. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 75-81, 2012.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and interface science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.
- RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>. Acesso em 20/08/2013.
- RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 817-825, 2005.
- RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1268-1273, 2010.
- ROMANO, A.; STARACE, F.; VILLA, R.; MOLINARI, F. Solid state fermentation for the production of lipolytic fungal enzymes. **Annals of Microbiology**, v. 57, p. 561-564, 2007.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p. 197-203, 2008.

SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipases para utilização em síntese de ésteres**. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; COCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SANDOVAL, G.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: kinetic and thermodynamic arguments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, p. 313-320, 2002.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher Ltda., 2001. v. 2: Engenharia Bioquímica.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 85-107, 1997.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187-202, 1997.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regioespecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. **Biotechnology Techniques**, v.11, p. 543-47, 1997.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; ARAUJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1848-1855, 2012.

SOARES, U. R. **Processo de cisão de gorduras contínua a alta pressão tendo vaporizador de dow-therm como fonte geradora de energia térmica**. PI 0604172-8 A, 2008.

SONNTAG, N. O. V. New developments in the fatty-acid industry in America. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, p. 229-232, 1984.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; DIMITRIADIS, E.; KOLISIS, F. N.; Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in w/o microemulsions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 33-41, 1995.

STOCK, D. R. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas-aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Biochemistry**, v. 112, p. 598-603, 1992.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy & Fuels**, v. 24, p. 2016-2019, 2010.

TALUKDER, M. M. R.; LEE, H. Z. S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L. C.; WARZECHA, D.; WU, J. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 89, p. 108-113, 2013.

TAN, T. W.; LU, J. K.; NIE, K. L.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 937-937, 2010.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36-43, 2001.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S. et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, p. 1188-1200, 1997.

VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; DE VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D. P. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1042-1047, 2000.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J. J.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R. et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 33, p. 143-149, 2002.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GOVAN, J.R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov– a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 91-96, 2003.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, 1580-1590, 2008.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E., SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 102-111, 2009.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 689-691, 2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VOLL, F. A. P.; SILVA, C.; ROSSI, C. C. R. S.; GUIRARDELLO, R.; CASTILHOS, F.; OLIVEIRA, V.; CARDOZO-FILHO, L. Thermodynamic analysis of fatty acid esterification for fatty acid alkyl esters production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 781-788, 2011.

WANG, X. Q.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous Production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 355-360, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 703-707, 2001.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 76-80, 2012.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 46-60, 2008.

ZAGO, E. C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biology Chemistry**, v. 263, p. 3194-3201, 1988.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAIAD, S. e PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

ANEXO

A. CÁLCULO DO EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO

Análise termodinâmica do sistema reacional:

Ácido oleico + Etanol + Oleato de etila + Água

A condição de equilíbrio termodinâmico de uma reação química, em temperatura e pressão constantes, pode ser formulada através da seguinte expressão, que considera o mínimo da energia livre de Gibbs do sistema:

$$K = \prod_i^{nc} \left(\frac{\hat{f}_i}{f_i^0} \right)^{v_i} = \exp \left(\frac{-\Delta G_T}{RT} \right) \quad (1)$$

sendo,

$$\Delta G_T^0 = \sum_i^{nc} v_i \Delta G_{f,i}^0 \quad (2)$$

onde: $\Delta G_{f,i}^0$ é a energia livre de Gibbs de formação do componente “i” no estado padrão, nc é o número de componentes presentes na mistura.

A fugacidade do componente “i” numa mistura líquida em fase líquida pode ser dada por:

$$\left(\frac{\hat{f}_i}{f_i^0} \right) = \frac{\gamma_i x_i f_i^L}{f_i^0} \quad (3)$$

onde: f_i^L e f_i^0 referem-se à fugacidade do componente “i” no estado de líquido puro e no estado de referência, respectivamente, x_i e γ_i são a fração molar e o coeficiente de atividade do componente “i” na mistura, respectivamente.

Da equação da definição de fugacidade correlacionada ao potencial químico do componente i puro (μ_i ou simplesmente, como é componente puro, \underline{G}_i , tem-se:

$$d\underline{G}_i = RT d \ln f_i \quad (4)$$

Integrando de um estado de referencia “0” a um estado real qualquer, tem-se:

$$\underline{G}_i - \underline{G}_i^0 = RT \ln \frac{f_i}{f_i^0} \quad (5)$$

Da equação fundamental da termodinâmica em termo da energia livre de Gibbs para um componente puro e para um processo isotérmico, tem-se:

$$\frac{\partial \underline{G}_i}{\partial P} = \underline{V}_i \quad \text{logo,} \quad \underline{G}_i - \underline{G}_i^0 = \int_{P^0}^P \underline{V}_i dP \quad (6)$$

Combinando as duas equações acima tem-se:

$$RT \ln \frac{f_i}{f_i^0} = \int_{P^0}^P \underline{V}_i dP \quad (7)$$

Considerando que o volume molar de líquidos varia pouco com a pressão tem-se:

$$\ln \frac{f_i}{f_i^0} = \frac{\underline{V}_i (P - P^0)}{RT} \quad (8)$$

ou ainda:

$$\frac{f_i}{f_i^0} = \exp \left[\frac{\underline{V}_i (P - P^0)}{RT} \right] \quad (9)$$

Este termo da exponencial normalmente é próximo da unidade (devido à diferença de pressão ser baixa), então esta razão pode ser tomada como sendo:

$$\frac{f_i}{f_i^0} \cong 1 \quad (10)$$

Então, voltando para a razão entre as fugacidades do componente na mistura no estado real e no estado de referência, tem-se:

$$\left(\frac{\hat{f}_i}{f_i^0} \right) = \gamma_i x_i \quad (11)$$

Por fim, a constante de equilíbrio da reação em fase líquida (K) pode ser obtida por:

$$K = \prod_i^{nc} (\gamma_i x_i)^{\nu_i} \quad (12)$$

onde a constante da reação K é obtida a partir da energia livre de Gibbs na temperatura da reação (Equação 1).

Normalmente os valores da energia livre de Gibbs padrão de formação são tabelados numa temperatura padrão de referência (usualmente 25°C), porém geralmente as reações de interesse ocorrem em diferentes valores de temperatura. Para avaliar esta “correção”, considera-se a seguinte equação:

$$\Delta \underline{G} = -T \Delta \underline{S} + \Delta \underline{H} \quad (13)$$

ou ainda,

$$\frac{\Delta \underline{G}_T}{RT} = -\frac{\Delta \underline{S}_T}{R} + \frac{\Delta \underline{H}_T}{RT} \quad (14)$$

A variação de entalpia e de entropia, considerando estado de gás ideal, é dada por:

$$\Delta \underline{H}_T = \Delta \underline{H}_{Tref}^0 + \Delta a(T - T_{ref}) + \frac{\Delta b}{2}(T^2 - T_{ref}^2) + \frac{\Delta c}{3}(T^3 - T_{ref}^3) + \frac{\Delta d}{4}(T^4 - T_{ref}^4) \quad (15)$$

$$\Delta \underline{S}_T = \Delta \underline{S}_{Tref}^0 + \Delta a \ln\left(\frac{T}{T_{ref}}\right) + \Delta b(T - T_{ref}) + \frac{\Delta c}{2}(T^2 - T_{ref}^2) + \frac{\Delta d}{3}(T^3 - T_{ref}^3) \quad (16)$$

onde: $\Delta \underline{H}_{Tref}^0$ e $\Delta \underline{S}_{Tref}^0$ são a entalpia e entropia de formação dos componentes no estado padrão (normalmente 25°C e 1 atm).

Neste trabalho, para a obtenção das equações 15 e 16, considerou-se uma expressão polinomial para a capacidade calorífica do componente “i” no estado de gás ideal, da seguinte forma:

$$Cp_i^{ig} = a_i + b_i T + c_i T^2 + d_i T^3 \quad (17)$$

Então, para a mistura, tem-se:

$$\Delta Cp = \sum_{i=1}^{nc} v_i Cp_i^{ig} \quad (18)$$

$$\Delta a = \sum_i v_i a_i \quad \Delta c = \sum_i v_i c_i$$

$$\Delta b = \sum_i v_i b_i \quad \Delta d = \sum_i v_i d_i$$

Substituindo as equações 15 e 16 na Equação 14, tem-se:

$$\frac{\Delta \underline{G}_T}{RT} = -\frac{\Delta \underline{S}_{Tref}}{R} - \frac{b}{R} + \frac{\Delta \underline{H}_{Tref}}{RT} + \frac{a}{RT} \quad (19)$$

onde,

$$a = \Delta a(T - T_{ref}) + \frac{\Delta b}{2}(T^2 - T_{ref}^2) + \frac{\Delta c}{3}(T^3 - T_{ref}^3) + \frac{\Delta d}{4}(T^4 - T_{ref}^4) \quad (20)$$

$$b = \Delta a \ln\left(\frac{T}{T_{ref}}\right) + \Delta b(T - T_{ref}) + \frac{\Delta c}{2}(T^2 - T_{ref}^2) + \frac{\Delta d}{3}(T^3 - T_{ref}^3) \quad (21)$$

Rearranjando a Equação 19 tem-se:

$$\frac{\Delta G_T}{RT} = \frac{1}{R}\left(\frac{a}{T} - b\right) + \frac{\Delta H_{Tref}}{RT} - \frac{\Delta S_{Tref}}{RT} \quad (22)$$

Ainda, da Equação 14 escrita em termos de propriedades de formação no estado de referência, tem-se:

$$\frac{\Delta S_{Tref}}{R} = -\frac{\Delta G_{Tref}}{RT_{Tref}} + \frac{\Delta H_{Tref}}{RT_{Tref}} \quad (23)$$

Substituindo, a Equação 23 na 22, tem-se:

$$\frac{\Delta G_T}{RT} = \frac{1}{R}\left(\frac{a}{T} - b\right) + \frac{\Delta H_{Tref}}{RT} - \frac{\Delta H_{Tref}}{RT_{Tref}} + \frac{\Delta G_{Tref}}{RT_{Tref}} \quad (24)$$

ou ainda,

$$\frac{\Delta G_T}{RT} = \frac{1}{R}\left(\frac{a}{T} - b\right) + \frac{\Delta H_{Tref}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) + \frac{\Delta G_{Tref}}{RT_{Tref}} \quad (25)$$

O 1º termo na Equação 25 representa a correção da energia livre de Gibbs com a temperatura, porém em fase gasosa. Para o cálculo da energia livre de Gibbs de formação no estado padrão em fase líquida, dos componentes puros, pode ser utilizada a seguinte equação:

$$\frac{\Delta G_{f,T}^{(l)}}{RT} = \frac{\Delta G_{f,T}^{(g)}}{RT} + \sum_i^n v_i \ln \left(\frac{P_i^{Sat}(T)}{1 \text{ atm}} \right) \quad (26)$$

onde:

$$\frac{\Delta G_{f,T}^{(g)}}{RT} \text{ é dado pela Equação 25.}$$

Por fim, a constante de equilíbrio para a reação em fase líquida na temperatura T, é dada por;

$$\ln Ka = \frac{-\Delta G_{f,T}^{(l)}}{RT} \quad (27)$$

As propriedades termodinâmicas dos componentes puros usados neste trabalho são apresentadas nas Tabela 1.

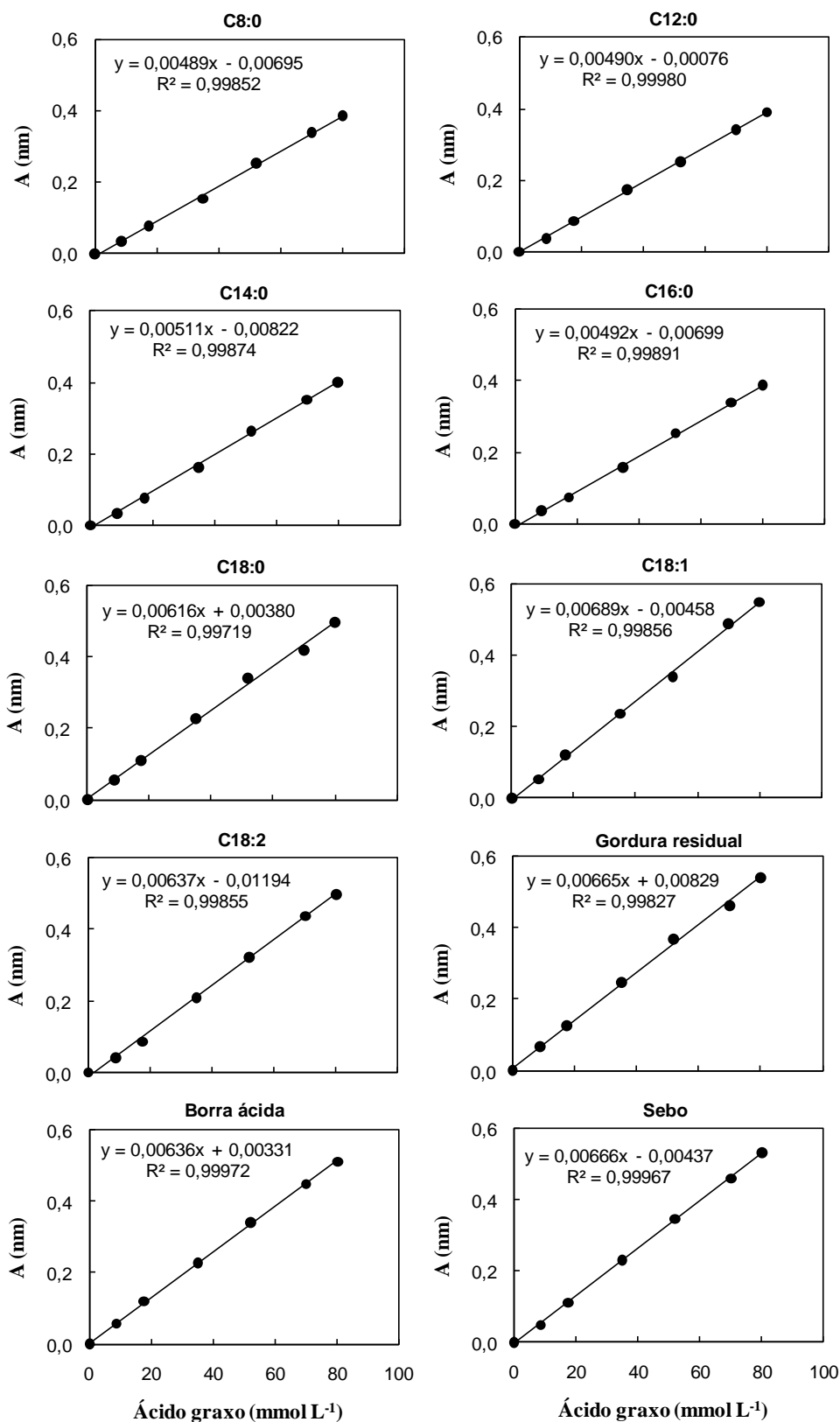
Tabela 1. PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS DOS COMPONENTES PUROS

| Componente | $\Delta G_{f,0}$ (kJ/mol) | $\Delta H_{f,0}$ (kJ/mol) | $\Delta H_{vap,0}$ (kJ/mol) |
|------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Ácido Oleico | -189,7 ^a | -710,2 ^b | 110,69 ^b |
| Oleato de etila | -136,2 ^c | -695,1 ^a | 87,61 ^b |
| Etanol | -167,8 ^b | -235,1 ^b | 42,6 ^b |
| H ₂ O | -228,6 ^b | -241,8 ^b | 44,0 ^b |

^a Voll et al. (2011); ^b DIPPR; ^c Bucalá et al. (2006). Estado gasoso, gás ideal, 25°C, 1 atm.

APÊNDICES

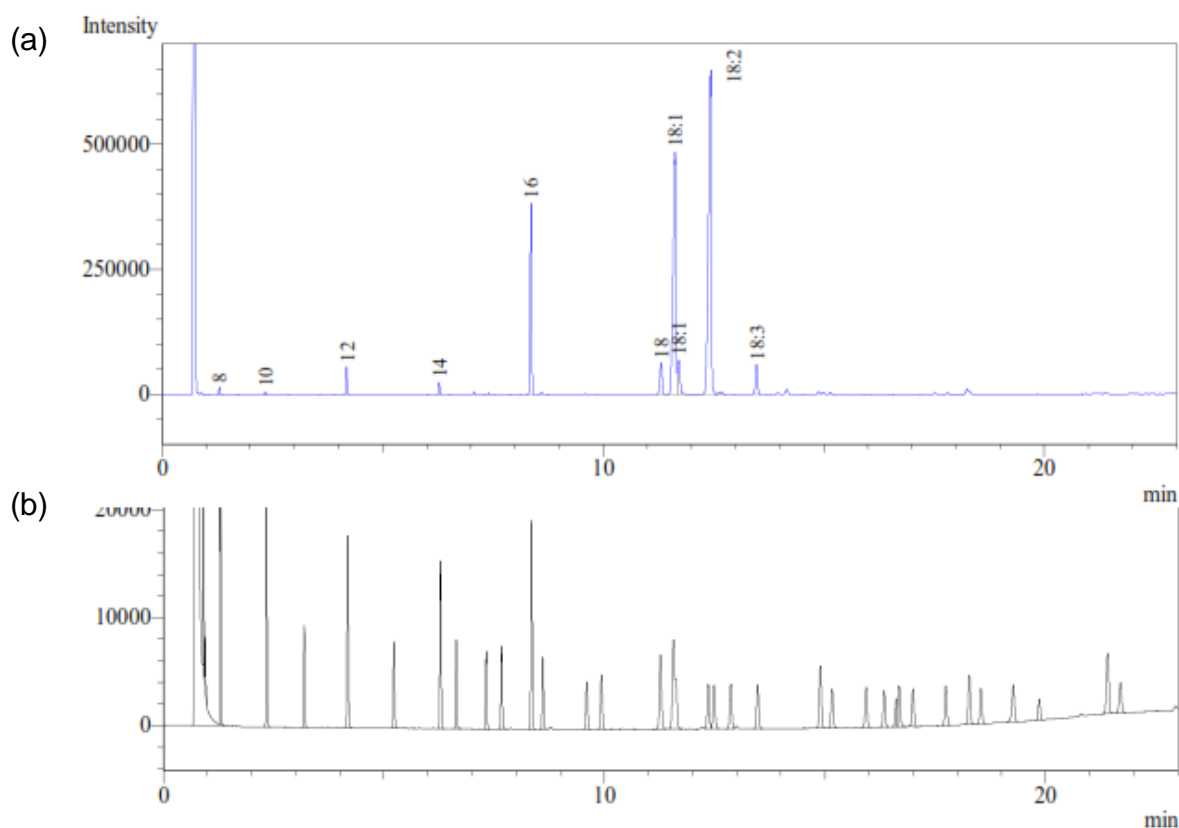
A. CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE LOWRY-TINSLEY



B. CROMATOGRAMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO ÁCIDO DA BORRA DE SOJA

(a) Metil-ésteres do óleo ácido da borra de soja; (b) padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA); (c) identificação dos etil-ésteres do óleo ácido da borra de soja.

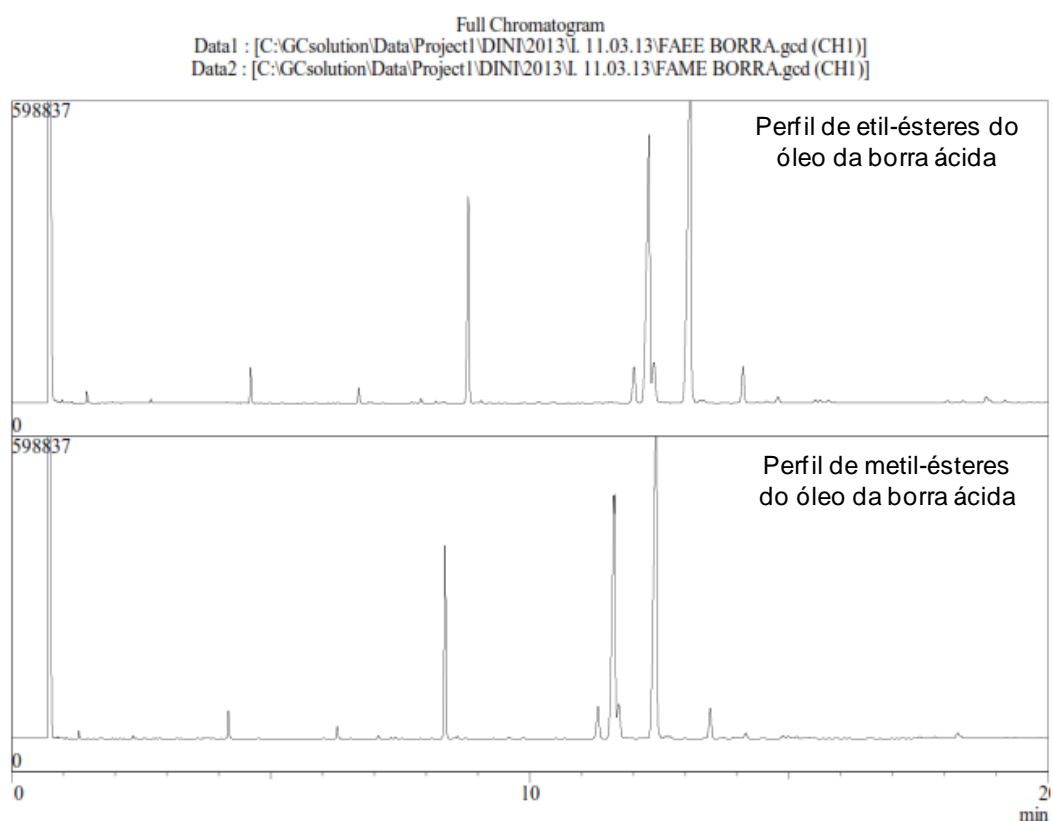
A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos dos metil-ésteres da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37.



| Peak# | Ret.Time | Area | Conc. | Unit | ID# | Compd Name |
|-------|----------|---------|-------|------|-----|------------|
| 1 | 1,298 | 19354 | 0,29 | % | 1 | 8 |
| 2 | 2,342 | 8844 | 0,13 | % | 2 | 10 |
| 3 | 4,183 | 99856 | 1,48 | % | 3 | 12 |
| 4 | 6,283 | 46960 | 0,70 | % | 4 | 14 |
| 5 | 8,364 | 846981 | 12,56 | % | 5 | 16 |
| 6 | 11,313 | 233804 | 3,47 | % | 6 | 18 |
| 7 | 11,627 | 2085146 | 30,93 | % | 7 | 18:1 |
| 8 | 11,714 | 284968 | 4,23 | % | 8 | 18:1 |
| 9 | 12,433 | 2930283 | 43,46 | % | 9 | 18:2 |
| 10 | 13,479 | 185689 | 2,75 | % | 10 | 18:3 |
| Total | | 6741885 | | | | |

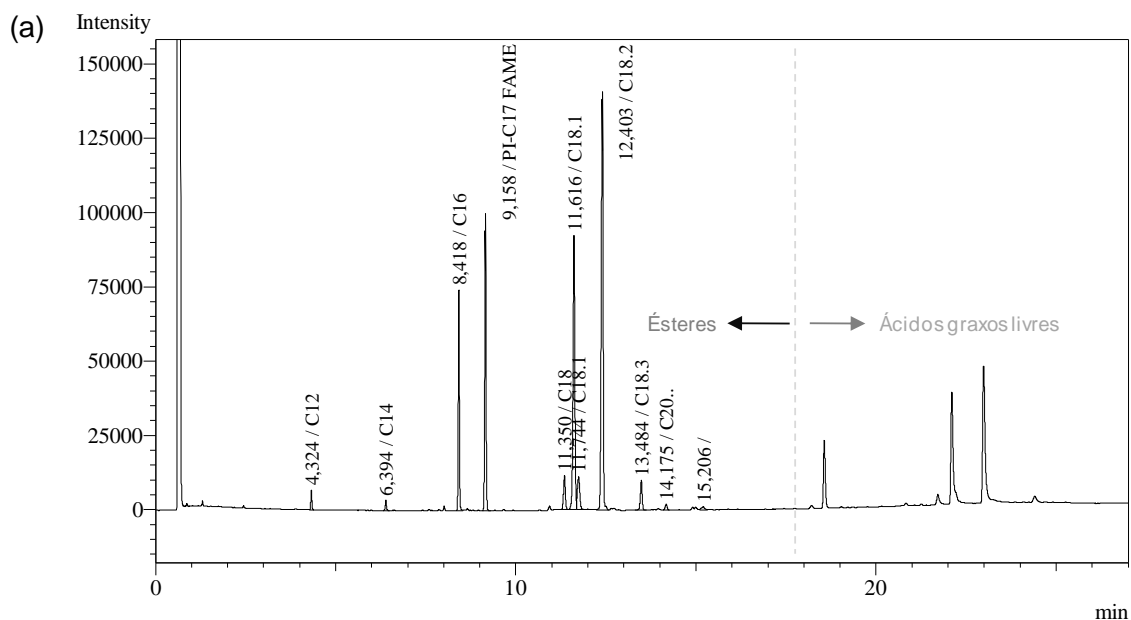
Os etil-ésteres foram identificados por comparação com o perfil dos metil-ésteres. O perfil cromatográfico dos etil-ésteres dos ácidos graxos do óleo ácido da borra de soja foram iguais aos dos metil-ésteres, porém observou-se um acréscimo proporcional nos tempos de retenção dos etil-ésteres em relação aos metil-ésteres.

(c)



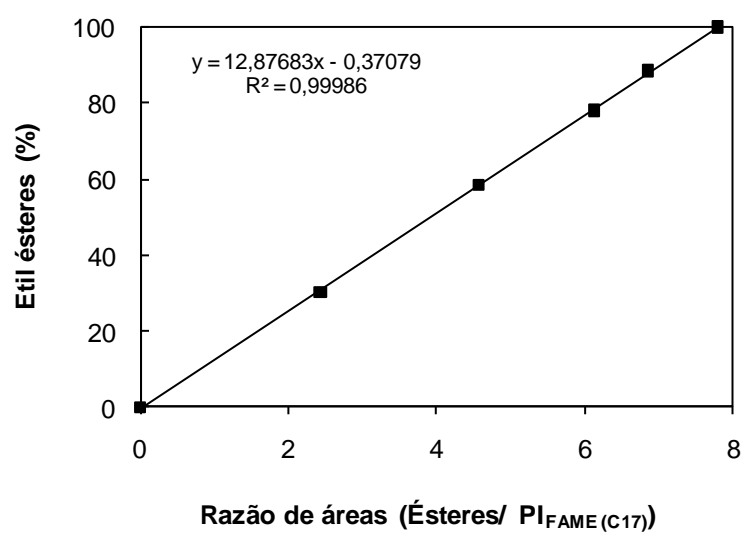
C. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETIL-ÉSTERES POR CROMATOGRAFIA GASOSA

(a) Cromatograma de uma determinação do teor de etil-ésteres da reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo ácido da borra de soja; (b) curva de calibração para quantificação de ésteres.



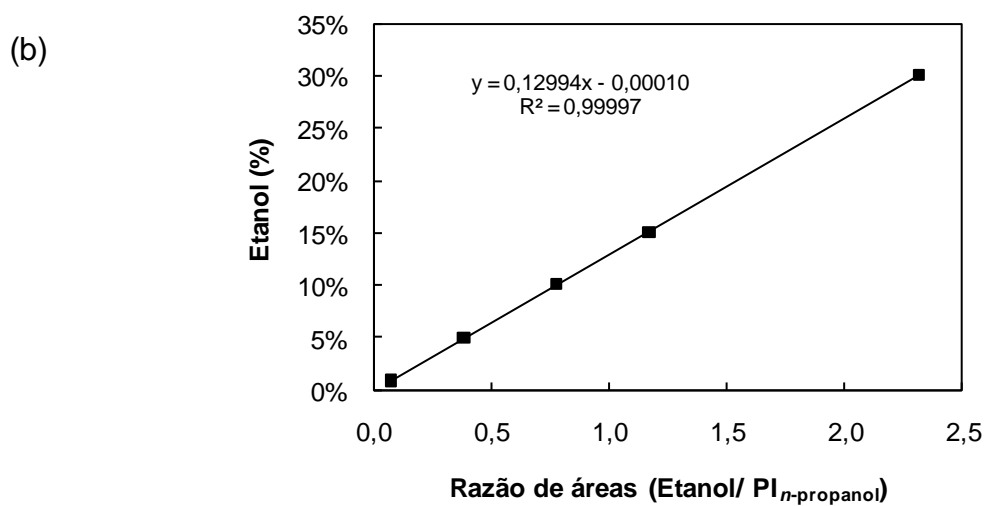
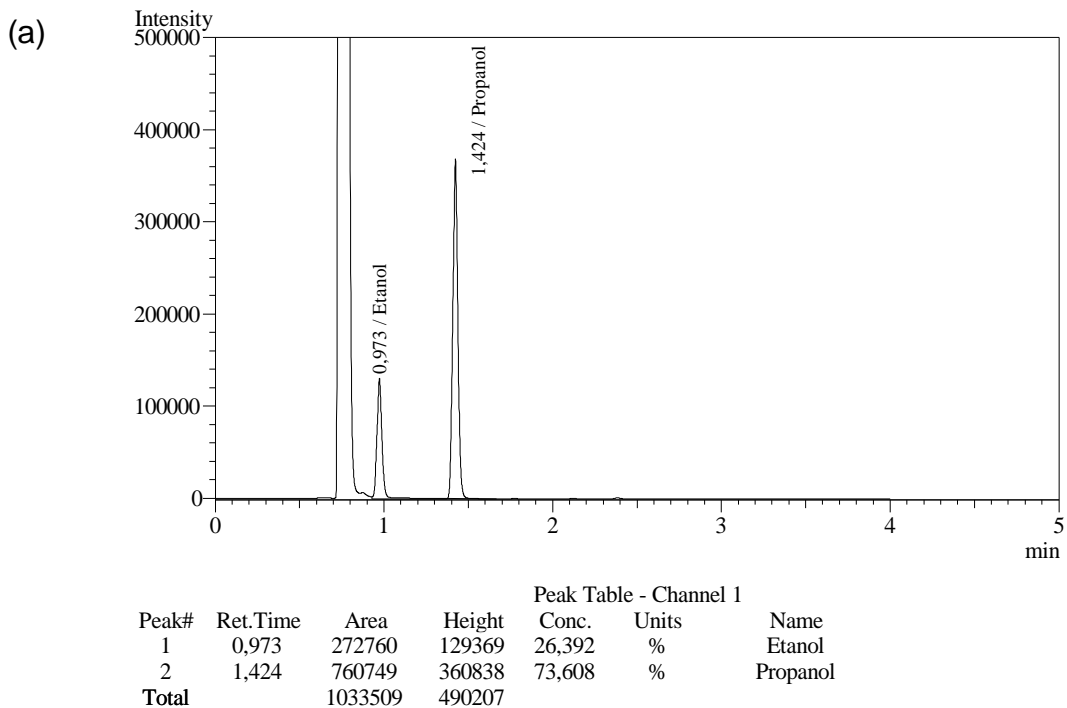
| Peak# | Ret.Time | Area | Conc. | Unit | ID# | mpd | Nan |
|-------|----------|--------|--------|------|-----|----------|-----|
| 1 | 4,324 | 12924 | 0,920 | % | 1 | C12 | |
| 2 | 6,394 | 7606 | 0,541 | % | 2 | C14 | |
| 3 | 8,418 | 159864 | 11,377 | % | 3 | C16 | |
| 4 | 9,158 | 250416 | 17,821 | % | 4 | PI-C17] | |
| 5 | 11,350 | 40361 | 2,872 | % | 5 | C18 | |
| 6 | 11,616 | 327874 | 23,333 | % | 6 | C18.1 | |
| 7 | 11,744 | 51018 | 3,631 | % | 7 | C18.1 | |
| 8 | 12,403 | 505183 | 35,951 | % | 8 | C18.2 | |
| 9 | 13,484 | 35390 | 2,518 | % | 9 | C18.3 | |
| 10 | 14,175 | 7591 | 0,540 | % | 10 | C20.. | |
| 11 | 15,206 | 6980 | 0,497 | | | | |
| Total | | 405207 | | | | | |

(b)



D. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

(a) Cromatograma de uma determinação do teor de etanol; (b) curva de calibração para quantificação de etanol.



E.ARTIGO 1

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.